



# Efeito da salinidade e temperatura no assentamento da ostra *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) e indução da desova da ostra *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795)

Dário Luis Leal Areias

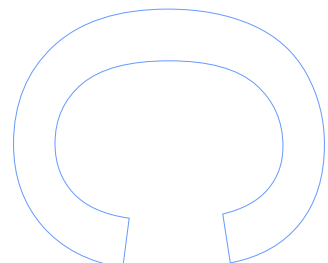
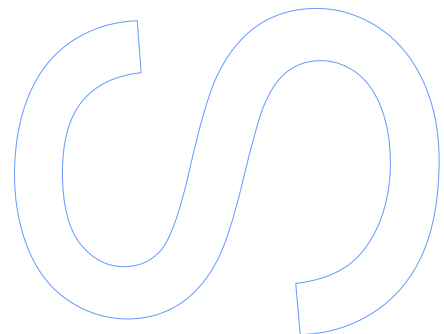
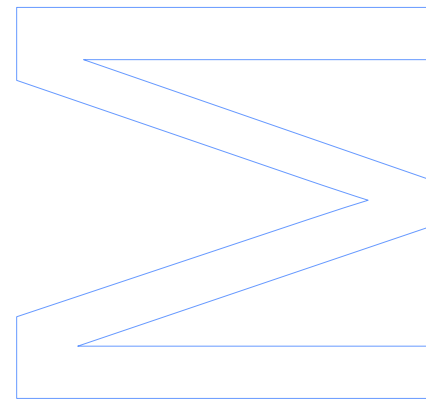
Recursos Biológicos Aquáticos  
Departamento Biologia  
2011/2012

## **Orientador**

Cláudio Manoel Rodrigues de Melo, Doutor, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil

## **Coorientador**

António José Rogeiro Gouveia. Doutor, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto



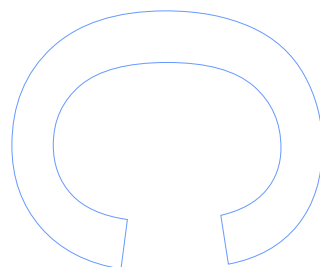
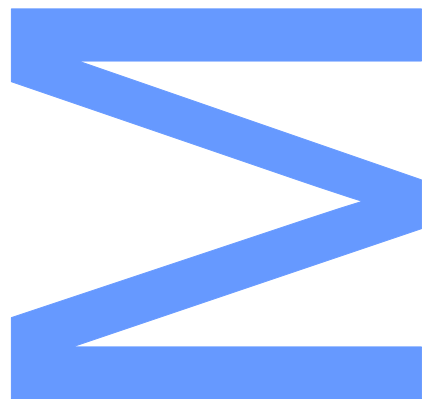




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_





*"No es este el relato de hazañas impresionantes. Es un trozo de dos vidas tomadas en un momento, en que cursaron juntas un determinado trecho, con identidad de aspiraciones y conjunción de sueños. Fue nuestra visión, demasiado estrecha? Demasiado parcial? Demasiado apresurada? Fueron nuestras conclusiones demasiado rígidas? Tal vez. Pero ese vagar sin rumbo, por nuestra mayúscula América, me ha cambiado más de lo que creí. Yo, ya no soy yo, por lo menos no soy el mismo yo interior."*

Ernesto "Che" Guevara de la Serna



## **Agradecimentos**

A realização da presente tese de mestrado só foi possível graças a um grupo de intervenientes, que de uma forma direta ou indireta, ajudaram na concretização deste trabalho e, aos quais presto aqui os meus solenes agradecimentos.

Um especial agradecimento à minha família, por todo o apoio prestado e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu orientador, Professor Doutor Cláudio Melo, pela fantástica oportunidade que me concedeu de estagiar no Laboratório de Moluscos Marinhos, que decerto mudou a minha vida e, por toda a ajuda prestada.

Um especial agradecimento ao técnico e amigo “Seu Chico” (Francisco Silva), por todo o conhecimento transmitido, boa disposição e constante disponibilidade e atenção ao “portuga”. Ao técnico e amigo Carlos Gomes, pela amizade e imprescindível apoio técnico.

Aos meus amigos e colegas de trabalho, Aline, Alexandra, Angela, Jefferson e Khauê, por todo o companheirismo e ajuda.

A todos as pessoas que compõe a equipe do Laboratório de Moluscos Marinhos, Jaqueline, Cláudio, Marisa, Eduardo, Sino, Zezé, Alexandre, Bê, Ricardo, Caio e a todos os estagiários que contribuíram para o presente trabalho.

Ao meu coorientador, Professor Doutor António Gouveia, pela ajuda na realização do presente trabalho.

Em especial à minha namorada Cláudia Costa por todos os bons momentos de felicidade e por todo o amor e apoio ao longo desta maravilhosa aventura.

A todos o meu muito sincero, Obrigado.





## Resumo

O presente estudo teve como objetivo testar efeito de três salinidades (20, 27 e 35‰) e de duas temperaturas (temperatura ambiente aproximada de 24°C e 27°C) no assentamento da ostra *Crassostrea gasar* e a indução da desova da ostra *Crassostrea gigas* sobre o efeito de cinco indutores (peróxido de hidrogénio 3mM e 6mM, pH 9,1 e 9,5 e esperma de *C. gigas* esterilizado).

A maior taxa de assentamento da espécie *C. gasar* foi registada na salinidade de 20‰ (40,83%), seguido da salinidade de 27‰ (30,26%) e 35‰ (12,26%), respetivamente. Registou-se também maior taxa de assentamento na temperatura de 27°C (13,89%), sendo que na temperatura ambiente a taxa de assentamento foi de 9,73%.

No experimento de indução a desova foi observada em todos os tratamentos, incluindo o tratamento controlo. A maior taxa de indução de desova de ostras da espécie *C. gigas* foi registada no tratamento com o indutor peróxido de hidrogénio a 6mM (44,44%) seguido do tratamento com esperma esterilizado (33,33%). Contrariamente, nos tratamentos com pH 9,1 e 9,5, registou-se menor taxa de ostras que desovaram, 22,22% e 18,52%, respetivamente, sendo a taxa de desova do tratamento controlo (22,22%) igual à registada no tratamento com pH 9,1 e superior à registada no tratamento com pH 9,5.

**Palavras-Chave:** *Crassostrea gasar*, assentamento, salinidade, temperatura, *Crassostrea gigas*, indução da desova, peróxido de hidrogénio, pH, esperma esterilizado



## Abstract

The present study aimed to test the effect of three salinities (20, 27 and 35‰) and two temperatures (ambient temperature about 24°C and 27°C) on the settlement of the oyster *Crassostrea gasar* and the induction of spawning of the oyster *Crassostrea gigas* under the effect of five different inducers (hydrogen peroxide 3mM and 6mM, pH 9.1 and 9.5 and sterilized sperm of *C. gigas*).

The highest settling rate of the specie *C. gasar* was attained at salinity of 20‰ (40.83%), followed by the salinity of 27‰ (30.26%) and 35‰ (12.26%), respectively. There was also a greater settlement rate at the temperature of 27°C (13.89%), whereas at ambient temperature the settlement rate was 9.73%.

Spawning was observed in all treatments including the control treatment. The highest rate spawning induction of the oyster specie *C. gigas* was recorded on treatment with the inducer 6mM hydrogen peroxide (44.44%) followed by treatment with sterilized sperm (33.33%). In contrast, on the treatments with pH 9.1 and 9.5, there was a lower rate of oysters spawned, 22.22% and 18.52%, respectively, being the spawn rate in the control treatment (22.22%) equal to the registered in treatment at pH 9.1 and higher than in treatment at pH 9.5.

**Keywords:** *Crassostrea gasar*, settlement, salinity, temperature, *Crassostrea gigas*, spawning induction, hydrogen peroxide, pH, sterilized sperm



# Índice

<b>Lista de Tabelas .....</b>	<b>xiv</b>
<b>Lista de Figuras.....</b>	<b>xv</b>
<b>Lista de Anexos.....</b>	<b>xvi</b>
<b>Lista de Abreviaturas .....</b>	<b>xvii</b>
<b>Capítulo 1 - Introdução Geral .....</b>	<b>1</b>
1. Introdução Geral .....	3
1.1. Panorama Global da Aquacultura e da Produção de Ostras.....	3
1.2. Biologia das Ostras do Género <i>Crassostrea</i> .....	5
1.3. Descrição Geral de uma “Hatchery” de Moluscos Bivalves.....	9
1.3.1. Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina.....	9
<b>Capítulo 2 - Efeito da Salinidade e Temperatura no Assentamento da Ostra <i>Crassostrea gasar</i> (Adanson, 1757).....</b>	<b>11</b>
1. Introdução .....	13
1.1. A espécie <i>Crassostrea gasar</i> .....	13
1.2. Assentamento em Ostras .....	14
1.3. Objetivos .....	16
2. Materiais e Métodos .....	16
2.1. Desova .....	17
2.2. Larvicultura .....	18
2.3. Assentamento.....	19
2.3.1. Composição dos Sistemas de Assentamento.....	19
2.3.2. Povoamento dos Sistemas de Assentamento com as Larvas.....	20
2.3.3. Manejo dos Tanques de Assentamento.....	20
2.4. Avaliação do Rendimento do Assentamento.....	21
2.5. Análise Estatística .....	22
3. Resultados .....	23

3.1.	Larvicultura .....	23
3.2.	Parâmetros Físico-químicos .....	24
3.3.	Rendimento do Assentamento.....	24
3.4.	Análise Estatística do Rendimento do Assentamento .....	26
4.	Discussão .....	27
5.	Conclusão .....	28
<b>Capítulo 3 - Indução da Desova da Ostra <i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg, 1795) .....</b>		<b>29</b>
1.	Introdução .....	31
1.1.	Aspetos Reprodutivos das Ostras.....	31
1.1.	Indução da Desova em Moluscos Bivalves .....	32
1.3.	Objetivos .....	34
2.	Materiais e Métodos .....	34
2.1.	Protocolo Experimental.....	35
2.2.	Análise Estatística .....	37
3.	Resultados .....	38
3.1.	Análise Estatística da Indução da Desova .....	38
3.1.1.	Percentagem Total de Ostras Desovadas .....	38
3.1.2.	Percentagem Quanto ao Sexo das Ostras Desovadas .....	39
3.1.3.	Percentagem Quanto à Etapa das Ostras Desovadas.....	39
4.	Discussão .....	40
5.	Conclusão .....	42
<b>Bibliografia .....</b>		<b>45</b>
<b>Anexos .....</b>		<b>i</b>

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Quantidade de larvas aptas para assentamento e respetivas dimensões, obtidas ao longo dos últimos 5 dias de larvicultura.....	23
Tabela 2: Rendimento do ensaio do efeito da temperatura (temperatura ambiente e temperatura de 28°C) no assentamento da ostra <i>C. gasar</i> .....	25
Tabela 3: Rendimento do ensaio do efeito da salinidade (20, 27 e 35‰) no assentamento da ostra <i>C. gasar</i> .....	25
Tabela 4: Análise de variância do efeito da temperatura no assentamento da ostra <i>C. gasar</i> .....	26
Tabela 5: Análise de variância do efeito da salinidade no assentamento da ostra <i>C. gasar</i> .....	26
Tabela 6: Média do rendimento (%) do assentamento no ensaio do efeito da salinidade sobre o assentamento da ostra <i>C. gasar</i> .....	27
Tabela 7: Análise de variância do efeito do peróxido de hidrogénio a 3mM e 6mM, do pH 9,1 e 9,5 e do esperma esterilizado na indução da desova da ostra <i>C. gigas</i> .....	38
Tabela 8: Média percentual de ostras de <i>C. gigas</i> que desovaram por tratamento (Controlo, Peróxido de Hidrogénio 3mM, Peróxido de Hidrogénio 6mM, pH 9,1, pH 9,5 e esperma esterilizado). ....	38
Tabela 9: Média percentual de ostras macho e fêmea de <i>C. gigas</i> que desovaram por tratamento (Controlo, Peróxido de Hidrogénio 3mM, Peróxido de Hidrogénio 6mM, pH 9,1, pH 9,5 e esperma esterilizado). ....	39
Tabela 10: Média percentual de ostras de <i>C. gigas</i> que desovaram durante a etapa 1 e etapa 2 por tratamento (Controlo, Peróxido de Hidrogénio 3mM, Peróxido de Hidrogénio 6mM, pH 9,1, pH 9,5 e esperma esterilizado). ....	40
Tabela 11: Concentrações ( $\times 10^4$ células/ml) de microalga fornecidas ao longo de 24 dias de larvicultura da ostra <i>C. gasar</i> .....	v

## Lista de Figuras

Figura 1: Evolução da produção de organismos aquáticos em milhões de toneladas provenientes da pesca extrativa e da aquacultura desde 1950 até 2010 (Fonte: FAO, 2012). .....	3
Figura 2: Evolução da produção global de <i>C. gigas</i> em toneladas desde 1950 até 2010. (FAO, 2012). .....	4
Figura 3: Evolução global da captura de <i>C. gigas</i> em toneladas desde 1950 até 2012. (FAO, 2012). .....	5
Figura 4: Anatomia geral da ostra (Fonte: Fisheries and Oceans Canada, 2012). .....	7
Figura 5: Ciclo de vida da ostra. 1- Desenvolvimento da mórula, blástula e gástrula; 2 – Larva D; 3 – Véliger; 4 – Pediveliger; 5 – Assentamento. (Fonte: Oyster Gardening for Restoration & Education, 2012). .....	8
Figura 6: Evolução da produção de <i>C. gigas</i> em toneladas no estado de Santa Catarina, desde 1991 até 2011 (Fonte: CEDAP/EPAGRI, 2012). .....	10
Figura 7: Larva Pediveliger com o pé bem desenvolvido (Fonte: Auburn University, 2012). ..	14
Figura 8: Fotografia do sistema utilizado no assentamento da ostra <i>C. gasar</i> , sobre o efeito de temperatura. ....	iii
Figura 9: Fotografia do sistema utilizado no assentamento da ostra <i>C. gasar</i> , sobre o efeito de salinidade. ....	iii
Figura 10: Fotografia (1) da disposição dos baldes e calhas utilizados na indução da desova da ostra <i>C. gigas</i> . ....	iv
Figura 11: Fotografia (2) da disposição dos baldes e calhas utilizados na indução da desova da ostra <i>C. gigas</i> . ....	iv



Lista de Anexos

Anexo I .....iii

Anexo II.....v

## Lista de Abreviaturas

**°C:** graus Celcius

**µm:** micrómetro

**‰:** partes por milhão

**C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>6</sub>:** epinefrina

**cm:** centímetros

**g:** gramas

**h:** horas

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrogénio

**KCl:** cloreto de potássio

**L:** litros

**LMM:** Laboratório de Moluscos Marinhos

**Ltda.:** limitada

**M:** molar

**ml:** mililitro

**mm:** milímetro

**mM:** milimolar

**N<sub>2</sub>OC<sub>10</sub>H<sub>12</sub>:** serotonina

**Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:** tiosulfato de sódio

**NaClO:** cloro ativo

**NH<sub>4</sub>OH:** hidróxido de amónia

**PVC:** cloreto de polivinil

**UV:** ultra violeta

**W:** Watts



# **CAPÍTULO 1**

## **Introdução Geral**



# 1. Introdução Geral

## 1.1. Panorama Global da Aquacultura e da Produção de Ostras

O crescimento mundial da população tem como consequência, um aumento da procura de alimento. Nesse sentido a aquacultura tem desempenhado, desde a década de 50 do século passado, o papel de atividade agroalimentar capaz de suprir essa procura. A partir dessa década, a média de crescimento anual da aquacultura global situa-se nos 7%. Comparativamente com outras áreas de produção agroalimentar, como a indústria pesqueira, que desde os anos de 90 vêm apresentando um crescimento médio de 1,4%, ou a produção de animais terrestres que, no mesmo período, vêm apresentando uma média de crescimento em torno de 2,8%. A aquacultura no mesmo período apresenta uma média de crescimento de aproximadamente 9%, o que torna esta atividade uma fonte potencial e de extrema importância para a satisfação da procura global por alimento (Filho, 2004; FAO, 2012).

Atualmente a aquacultura é responsável por sensivelmente 40% do total da produção de organismos aquáticos, sendo que o restante ainda provém da pesca extrativa (figura 1). Tendo em conta a atual situação de sobre-exploração de muitos dos stocks de diversas espécies de peixes e outros organismos aquáticos, a tendência da produção em aquacultura, ao longo do tempo, é aumentar.

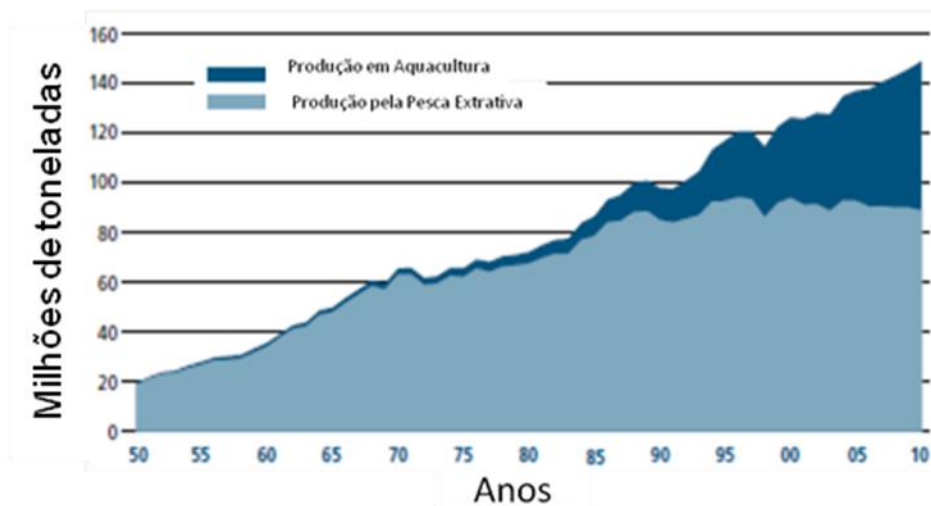


Figura 1: Evolução da produção de organismos aquáticos em milhões de toneladas provenientes da pesca extrativa e da aquacultura desde 1950 até 2010 (Fonte: FAO, 2012).

Na década de 50 do século passado, a produção em aquacultura situava-se em um milhão de toneladas por ano. Segundo as estatísticas da FAO em 2010 a produção em aquacultura foi de 59,9 milhões de toneladas e a produção proveniente da pesca extrativa

correspondeu a 88,6 milhões de toneladas, totalizando uma produção de 148,5 milhões de toneladas. (FAO, 2012)<sup>1</sup>.

Assumindo o atual ritmo de crescimento da população humana, assim como a consequente demanda por alimento e o rápido declínio dos stocks pesqueiros, que têm como efeito a diminuição da produção proveniente da pesca extrativa, estima-se, segundo a FAO (2012), que em 2050 a produção em aquacultura necessitará atingir 80 milhões de toneladas. Desta forma, supõem-se que o atual ritmo de crescimento da produção em aquacultura deverá manter-se ou até mesmo aumentar ao longo das próximas décadas.

Em aquacultura são produzidas as mais diversas espécies de organismos aquáticos, nomeadamente os peixes de água doce, que representam o grupo de organismos com maior produção, quase 34 milhões de toneladas em 2010, as plantas aquáticas, os moluscos que tiveram uma produção de cerca de 14 milhões de toneladas em 2010 e que fazem deste o terceiro maior grupo de organismos produzidos em aquacultura (ultrapassado pelas plantas aquáticas, que tiveram uma produção de cerca de 19 milhões de toneladas em 2010), peixes diádromos, peixes marinhos e crustáceos (FAO, 2012).

De entre os moluscos o grupo de espécies mais produzidas em aquacultura é o das amêijoas e berbigão, quase 5 milhões de toneladas em 2010, sendo que o grupo das ostras encontra-se logo a seguir, com uma produção de aproximadamente 4,5 milhões de toneladas no mesmo ano. De entre as ostras a espécie com maior produção global designa-se por *Crassostrea gigas* (comumente conhecida por ostra japonesa ou ostra do pacífico) atingindo em 2010 uma produção de 662.513 toneladas (FAO, 2012).

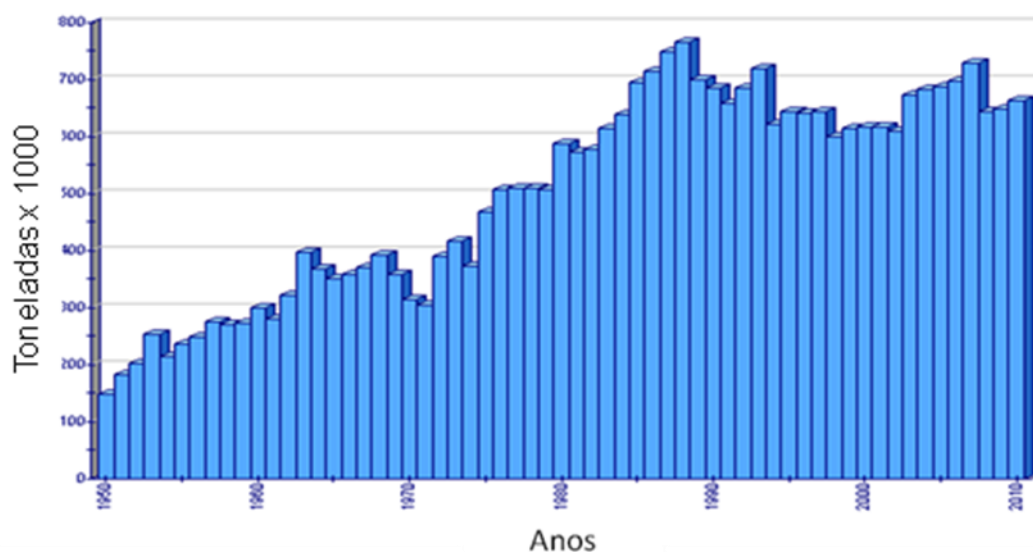


Figura 2: Evolução da produção global de *C. gigas* em toneladas desde 1950 até 2010. (FAO, 2012).

<sup>1</sup> De acordo com dados preliminares da FAO (2012) a produção em aquacultura em 2011 estima-se ser de 63,6 milhões de toneladas e da pesca extrativa de 90,4 milhões de toneladas, totalizando 154 milhões de toneladas.

A tendência de crescimento global, apesar de não regular, da produção de *C. gigas* contrasta claramente com as baixas capturas globais e irregulares desta espécie (ver figuras 2 e 3). No ano de 2010 a captura global de *C. gigas* ficou-se pelas 30.000 toneladas, fato este que evidencia bem a diferença entre a produção de *C. gigas* em aquacultura e a produção da mesma através da pesca extrativa (FAO, 2012).

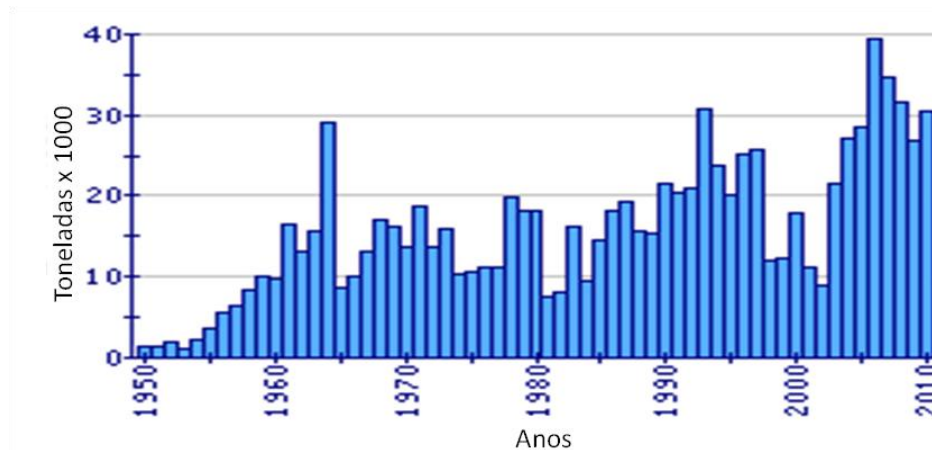


Figura 3: Evolução global da captura de *C. gigas* em toneladas desde 1950 até 2012. (FAO, 2012).

No caso da espécie *Crassostrea gasar* a produção em aquacultura é para já pouco representativa, havendo apenas dois países produtores na lista da FAO (2012), a Gâmbia e o Senegal<sup>2</sup>.

A importância da produção em aquacultura de ostras (assim como de outras espécies de moluscos bivalves marinhos) evidencia-se não só no fato de se poder evitar a sobre-exploração dos stocks naturais, mas também por serem estes organismos que convertem parte da produção primária do oceano em proteína animal, fazendo diminuir o impacto ambiental, quando comparados com outras espécies produzidas em aquacultura (Gomes, 2009).

## 1.2. Biologia das Ostras do Género *Crassostrea*

O género *Crassostrea* (Sacco, 1897) inclui mais de 20 espécies, sendo muitas produzidas em aquacultura. A classificação do género *Crassostrea* segue a seguinte ordem filogenética: Reino – Animalia; Filo – Mollusca; Classe – Bivalvia; Ordem – Ostreoida; Família – Ostreidae e por fim, género *Crassostrea* (Angell, 1986).

As espécies do género *Crassostrea* apresentam uma dispersão geográfica global. No que se refere à espécie *Crassostrea gigas*, esta têm origem natural no leste da Ásia, essencialmente na China e Coreia, sendo também uma espécie endémica no Japão

<sup>2</sup> No Brasil também já se produz a espécie *Crassostrea gasar*, contudo até à data, não se encontra qualquer referência na FAO (2012). Este assunto será abordado mais à frente.

(NIMPIS, 2012). Contudo, devido à sua introdução em diversos países, essencialmente para produção em aquacultura, a espécie *C. gigas* apresenta uma distribuição geográfica global. Pode ser encontrada da América do Norte à América do Sul, em países como os Estados Unidos da América, Canadá, Brasil, Chile e Argentina. Na Europa encontra-se desde a Noruega a Portugal e ainda em alguns países mediterrânicos (FAO, 2012).

Até recentemente a distribuição geográfica da espécie *Crassostrea gasar* limitava-se à costa ocidental de África, desde o Senegal até Angola (Afinowi, 1984), contudo segundo Lapègue e colaboradores (2002), esta espécie encontra-se também na costa atlântica da América do Sul, especificamente na Guiana Francesa e no Brasil (este assunto será abordado no capítulo 1). O habitat natural de *C. gigas* inclui zonas costeiras protegidas e estuarinas mas também, em alguns casos, regiões de mar aberto (FAO, 2012). A espécie *C. gasar* tem como habitat típico regiões de mangue, onde surge fixa nas raízes do mangue ou em rochas (Varela *et al.*, 2007).

As espécies do género *Crassostrea* são consideradas euritérmicas e eurihalinas, o que lhes permite habitar uma grande variedade de locais (Quayle, 1980; Angell, 1986). Relativamente às condições físico-químicas do habitat da espécie *C. gigas*, esta desenvolve-se em condições de salinidade que podem variar entre 2-41‰, (Angell, 1986). Contudo, tem melhor desenvolvimento mediante valores de salinidade compreendidos entre 20-25‰ (FAO; 2012). A faixa de temperatura em que *C. gigas* pode desenvolver-se situa-se entre -1,8-35°C, mas as temperaturas ideais para o seu desenvolvimento encontram-se entre 11-25°C (Angell, 1986; FAO, 2012). A espécie *C. gasar* tolera bem condições de salinidade compreendidas entre 8-30‰, contudo desenvolve-se melhor em salinidades entre 15-25‰ (Wakamatsu 1973; Pereira *et al.*, 1988; Pereira e Soares, 1996., retirado de Pereira *et al.*, 2001) e tolera condições de temperatura entre 18,5-31°C (Angell, 1986; Pereira *et al.*, 2001; Ansa e Bashir, 2007).

As ostras do género *Crassostrea* são bivalves (figura 4), sendo a superior ou direita mais plana e menor que a valva inferior ou esquerda que é mais côncava e aderida ao substrato (Miossec *et al.*, 2009). Geralmente o formato das valvas varia com o ambiente onde a ostra se encontra. As duas valvas são unidas por um ligamento proteico na altura do umbo (protuberância na concha localizada na extremidade anterior). A concha possui três camadas distintas: a camada interna delgada denominada nácar, a camada intermediária composta de carbonato de cálcio e a camada externa que se denomina de perióstraco. O sistema digestivo é completo, compondo-se por palpos labiais, boca, esófago, estômago, intestino e ânus e, possui ainda estilete cristalino e glândula digestiva. Contém sistema nervoso que é composto por um gânglio cefálico e outro visceral e cordões nervosos



ventrais. O sistema circulatório é aberto, possuindo coração constituído por um ventrículo e duas aurículas, veias, artérias e é composto por hemolinfa (Miossec *et al.*, 2009).

Como as demais espécies de moluscos bivalves, as ostras são organismos filtradores e alimentam-se de uma grande variedade de partículas em suspensão na coluna de água, que podem ser orgânicas ou inorgânicas. Estas partículas incluem essencialmente o fitoplâncton, mas também podem ser bactérias ou substâncias dissolvidas (aminoácidos, açúcares, etc.) (Dupuy *et al.*, 2000; Mizuta, 2010). A composição do alimento filtrado, assim como a velocidade de filtração depende largamente do ambiente em que as ostras se encontram. As partículas ingeridas são transportadas através da boca pela ação de cílios e de secreção mucosa. As partículas não digeridas são excretadas sob a forma de pseudofeces (Miossec *et al.*, 2009).

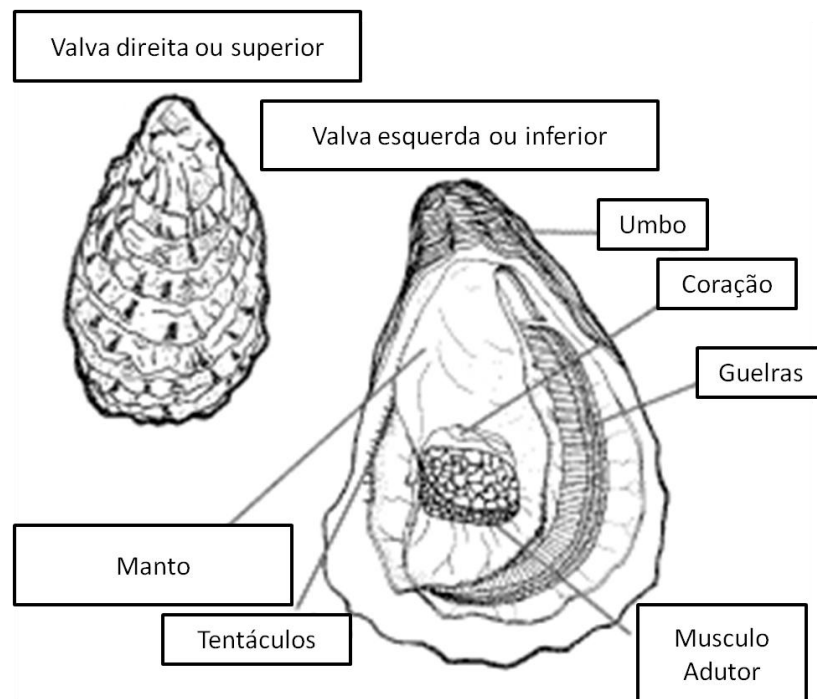


Figura 4: Anatomia geral da ostra (Fonte: adaptado de Fisheries and Oceans Canada, 2012).

As ostras do género *Crassostrea* são hermafroditas rítmicas sequenciais e apresentam fecundação externa. Desenvolvem-se primeiro como macho e só depois como fêmea. Contudo, as fêmeas podem voltar a machos dependendo de fatores ambientais (Angell, 1986; Miossec *et al.*, 2009). Uma fêmea de ostra do género *Crassostrea*, quando madura e com um comprimento médio de 10 cm pode conter mais de 100 milhões de óvulos (Quayle e Newkirk, 1989).

No género *Crassostrea* após duas horas da fertilização o óvulo fecundado sofre o processo de clivagem, seguindo-se o desenvolvimento dos seguintes estágios: mórula, blástula e gástrula, atingindo este último estágio ao fim de 6 horas. Nesta fase a larva já apresenta capacidade natatória por meio de cílios. Após 24 horas surge a larva D,

apresentando um tamanho entre 61-72  $\mu\text{m}$  e a designação “larva D” surge do fato de apresentar a forma da letra “D”. Ao fim de 14 dias a larva apresenta uma forma arredondada e um velum já desenvolvido, nesta fase a larva designa-se por vélígera. As dimensões da larva situam-se entre 230-240  $\mu\text{m}$ . Esta fase inicia-se no sexto dia. Ao décimo sétimo dia começa a surgir o pé, sendo nesta fase a larva designada por pseudovélígera, apresentando um tamanho de aproximadamente 280  $\mu\text{m}$ . Aquando do completo desenvolvimento do pé e com um tamanho de aproximadamente 300  $\mu\text{m}$ , a larva imerge na coluna de água em busca de um substrato para se fixar. Nessa fase acontece o assentamento da larva, que mais não é do que a fixação da mesma a um substrato. A duração desta parte do ciclo de vida da ostra depende essencialmente da quantidade de alimento disponível e da temperatura, podendo demorar entre 15 e 30 dias (ver figura 5) (Quayle e Newkirk, 1989; Manzoni, 2001).

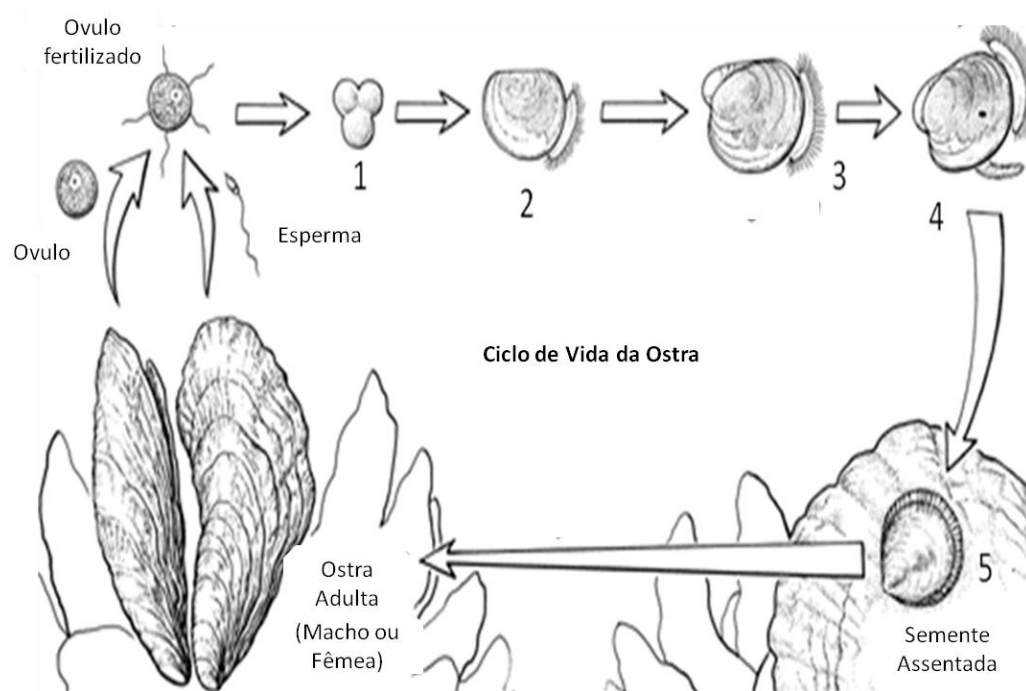


Figura 5: Ciclo de vida da ostra. 1- Desenvolvimento da mórula, blástula e gástrula; 2 – Larva D; 3 – Vélíger; 4 – Pedivelíger; 5 – Assentamento. (Fonte: adaptado de Oyster Gardening for Restoration & Education, 2012).

As taxas de crescimento das espécies do género *Crassostrea*, assim como nas demais espécies de moluscos bivalves, dependem de diversos fatores, tais como: a distribuição geográfica, o clima, a localização na zona subtidal ou intertidal, as diferenças genéticas entre indivíduos, e claro, de espécie para espécie (Helm e Bourne, 2004). Por exemplo, o tamanho comercial da espécie *C. gigas* é de 8 cm, que é atingido em cerca de 7/8 meses de cultivo no estado de Santa Catarina no Brasil, por outro lado em França, para a mesma espécie, só atingirá aquele tamanho em cerca de 2 anos (Mizuta, 2010). Segundo a FAO (2012) na África Ocidental, a espécie *C. gasar* atinge um tamanho de 7,5 cm em cerca de 9 meses de cultivo.

### 1.3. Descrição Geral de uma “Hatchery” de Moluscos Bivalves

Atualmente para assegurar uma produção contínua e de forma sustentável de algumas espécies de moluscos bivalves é necessário que todo o processo produtivo tenha início em laboratórios comumente designados por “hatchery”. Nas hatcheries possibilita-se uma oferta contínua de sementes no mercado de produtores, aumento da sobrevivência, melhoria nas taxas de crescimento, proteção contra predação natural, controle da sanidade, o que sob o ponto de vista comercial, garante uma melhor qualidade das sementes e consequentes rendimentos de produção (Sarkis e Lovatelli, 2007; Ferreira *et al*, 2011).

Para a produção em “hatchery” que envolve diferentes etapas, tais como: acondicionamento e maturação de reprodutores, indução de desova e fertilização, larvicultura e assentamento (Vieira, 2010), uma série de sectores/estruturas essenciais são necessários. Primeiramente, a captação de água do mar. Esta é de vital importância, pois a qualidade das sementes produzidas depende diretamente da qualidade da água. Desta forma a localização da “hatchery” deve ser próxima ao mar em local que possa ser assegurado a qualidade da água. Outro sector também de igual importância é o da produção de microalgas para alimentação dos moluscos. Uma produção de microalgas em monocultura de diferentes espécies deve ser feita de forma contínua ao longo de todo o ciclo produtivo, tendo especial atenção a eventuais contaminações bacterianas e outros parasitas. Outros sectores referem-se a etapas específicas do ciclo produtivo. A sala de maturação dos indivíduos adultos, na qual se inclui um sistema que permita um fornecimento contínuo de gâmetas (masculinos e femininos) ao longo de todo o ciclo produtivo; a sala de larvicultura na qual devem situar-se sistemas de produção que se adaptem a diferentes espécies; A sala para crescimento até tamanho comercial de venda das sementes, que tal como a sala de larvicultura, deve conter sistemas adequados às espécies em produção (Helm e Bourne, 2004).

Esta corresponde à descrição geral e sucinta de uma “hatchery” de produção de sementes de moluscos bivalves, contudo, é necessário ter em conta as espécies a produzir, pois isso vai implicar diferentes sistemas de produção uma vez que todo o processo produtivo deve ser estabelecido com base no conhecimento da biologia das diferentes espécies a produzir-se (Helm e Bourne, 2004; Sarkis e Lovatelli, 2007).

#### 1.3.1. Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina

Atualmente o estado de Santa Catarina é responsável por cerca de 90% da produção de ostras cultivadas em todo o Brasil (sendo a espécie *C. gigas* representante da quase totalidade dessa percentagem), a partir de sementes obtidas no Laboratório de Moluscos

Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (Silva C. e Silva J., 2007; Melo *et al.*, 2010; EPAGRI, 2012).

Desde a década de 90 do século passado que a produção de ostras no estado de Santa Catarina, especificamente da espécie *C. gigas*, tem vindo a crescer (ver figura 6). Esse crescimento deve-se em grande medida à fácil adaptação da espécie *C. gigas* a novos ambientes, às características ótimas ambientais do litoral do estado de Santa Catarina (temperaturas entre 16-30°C, salinidade em torno de 35‰, baías protegidas) e ainda a fatores socioculturais e governamentais (Lavinas *et al.*, 2008; Mizuta, 2010). Além disso, outro fator que muito contribui para o claro sucesso da produção de ostra no estado de Santa Catarina foi o empenho e competência da equipa técnica do LMM ao longo dos anos.

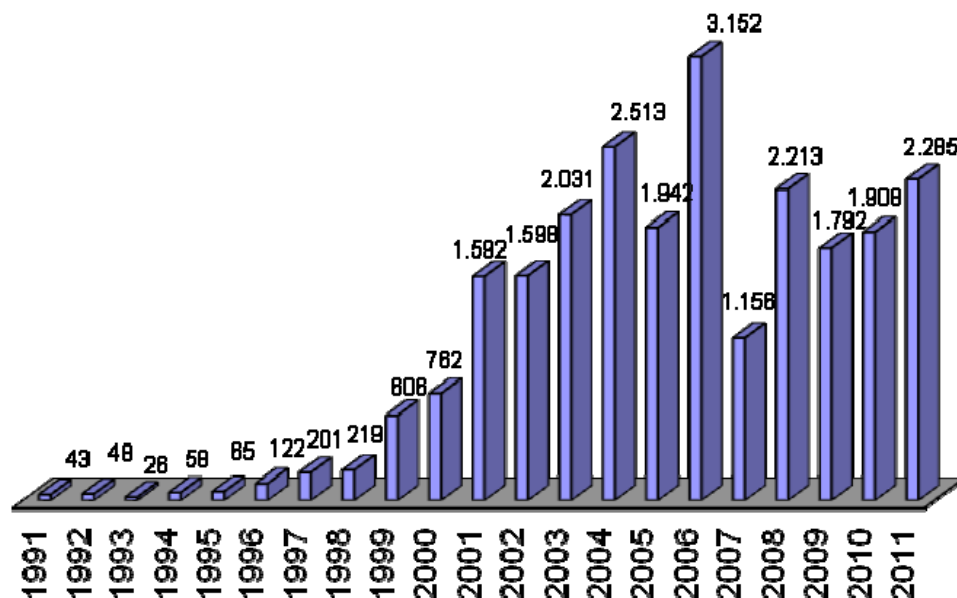


Figura 6: Evolução da produção de *C. gigas* em toneladas no estado de Santa Catarina, desde 1991 até 2011 (Fonte: CEDAP/EPAGRI, 2012).

Para além da produção de sementes de *C. gigas*, em anos mais recentes e com maior conhecimento adquirido ao longo dos vários anos, o LMM têm desenvolvido diversos projetos no sentido de iniciar a produção de outras espécies de moluscos com interesse comercial no Brasil. Atualmente já produz comercialmente sementes da ostra *C. gasar*, contudo em pequena escala e requerendo mais estudos no sentido de otimizar essa produção. O LMM desenvolve ainda produções experimentais da vieira nativa (*Nodipecten nodosus*) e do mexilhão (*Perna perna*) (LMM, 2012).



## CAPÍTULO 2

Efeito da Salinidade e Temperatura no Assentamento  
da Ostra *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757)



# 1. Introdução

## 1.1. A espécie *Crassostrea gasar*

Este tópico tem como objetivo explicar a controvérsia sobre a identidade da espécie *Crassostrea gasar*, bem como para justificar alguma da bibliografia citada no presente trabalho, visto que, até recentemente presumia-se que esta espécie ocorria apenas na costa ocidental de África, como já foi anteriormente referido.

As ostras do mangue do género *Crassostrea* habitam regiões de mangue encontrando-se fixas em raízes do mangue ou rochas na zona intertidal. São caracterizadas por sofrerem uma forte influência, durante o seu desenvolvimento ontogénico, do ambiente em que se encontram. Desta forma o resultado fenotípico destas ostras reflete a natureza do substrato ou da influência da maré. Assim a identificação morfológica das espécies deste género, por si só, é inadequada (Varela *et al.*, 2007).

São conhecidas tipicamente duas espécies de ostras endémicas distintas do género *Crassostrea* no Brasil, respetivamente, a *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) e a *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819). Segundo Absher (1989) e Christo e colaboradores (2010) as duas espécies apresentam diferenças nas taxas de crescimento e na morfologia larvar. Contudo Rios (1994; 2009) considera que todas as ostras do mangue no Brasil pertencem à espécie *Crassostrea rhizophorae*.

Làpegue e colaboradores (2002) identificaram pela primeira vez, através de técnicas moleculares, a espécie *Crassostrea gasar* na América do Sul, especificamente na Guiana Francesa e no Brasil, sugerindo assim a existência de uma terceira espécie do género *Crassostrea* no Brasil. Nesse mesmo estudo, esses autores, identificaram apenas a presença de dois halotipos, correspondentes às espécies *Crassostrea rhizophorae* e *Crassostrea gasar*. Varela e colaboradores (2007) ao compararem a sequência do gene 16S rRNA da espécie *Crassostrea gasar* obtidas por Làpegue e colaboradores (2002) com a sequência do mesmo gene da espécie *Crassostrea brasiliiana* obtida por Pie e colaboradores (2006) concluíram a existência de apenas uma espécie. Assim, pelo facto da espécie *C. gasar* ter o nome mais antigo, será, desde então, mais corretamente denominada por esse nome. Desta forma passam a existir apenas duas espécies de ostra do mangue no Brasil, a *C. gasar* e *C. rhizophorae*.

Tendo em conta o exposto, o tratamento da bibliografia neste trabalho necessitou de especial cuidado, a fim de em certas situações, poder considerar-se que todas estas espécies correspondem à *C. gasar*, ou apenas a *C. brasiliiana*, ou até mesmo nenhuma.

## 1.2. Assentamento em Ostras

O termo assentamento em ostras serve para descrever a passagem de uma forma de vida pelágica para uma forma de vida benthica. Esta transformação implica uma descensão da larva na coluna de água até à sua fixação num substrato. Desta forma, assentamento pode ser definido, segundo Rodríguez e colaboradores (1993), como um processo iniciado pelo comportamento de procura de um substrato adequado e que termina na metamorfose.

Durante a maior parte do tempo de vida, as larvas de ostra encontram-se ao longo da coluna de água alimentando-se e acumulando reservas. No momento em que se aproximam do final da fase larvar, diminuem a sua frequência alimentar e iniciam a descida para o fundo. Este acontecimento marca o início da metamorfose. A metamorfose divide-se em duas fases principais e no caso das ostras é irreversível (em outras espécies de moluscos pode ser reversível). Quando a larva começa a descer na coluna de água até ao fundo, onde através do “pé”, começa à procura de uma superfície para assentar (ver figura 7). Caso o substrato encontrado não seja o melhor para assentar, a larva segue em busca de um novo. Este processo pode ser repetido várias vezes até ser encontrado um substrato adequado. Toda esta fase é denominada por assentamento. A fase seguinte designa-se por metamorfose. Nesta fase a larva sofre a metamorfose e “transforma-se” em semente (Helm e Bourne, 2004).



Figura 7: Larva velígera com o pé bem desenvolvido (Fonte: Auburn University, 2012).

A fase de assentamento é de vital importância para a produção de ostras em hatchery, pois a esta fase estão associadas elevadas taxas de mortalidade. Para que o assentamento das larvas em laboratório seja bem-sucedido é necessário saber quando é que estas apresentam um comportamento de procura de substrato, ou preparam-se mesmo para



assentar ou ainda estão já em fase de metamorfose. Muitas vezes esta etapa pode ser identificada pela presença de uma região pigmentada com a aparência de um olho (por esse motivo as larvas neste estágio são designadas por “larva-olhada”). Outro sinal de que as larvas estão prontas a assentar corresponde à formação de agregados mucosos de larvas que pode ser observado durante o manejo das mesmas<sup>3</sup>.

São vários os fatores responsáveis por afetar negativamente ou positivamente o comportamento de assentamento das larvas. Esses fatores podem ser divididos em dois grupos: fatores ambientais/naturais e fatores artificiais. Relativamente aos fatores ambientais/naturais estes ocorrem na natureza, contudo, alguns deles podem ser controlados em laboratório, estes são: Comportamento larval, velocidade da corrente de água, textura e composição da superfície do substrato, intensidade luminosa, profundidade, temperatura, salinidade (Hidu e Haskin, 1971; Quayle e Newkirk, 1989), presença de biofilme (Fitt *et al.*, 1989, 1990; Rodríguez *et al.*, 1993), alimento (Devakie e Ali, 2000; Rico-Villa *et al.*, 2006,2009) e um fator não controlado em laboratório, os ciclos lunares ((Hidu e Haskin, 1971). Os fatores artificiais correspondem a substâncias químicas tais como neurotransmissores ou iões, utilizadas nas hatchery para melhorar as taxas de assentamento. Várias substâncias neurotransmissores, tais como, epinefrina, serotonina, dopamina, norepinefrina, l-dihidroxifenilalanina podem ser usadas, assim como o ião potássio ou amónia para estimular o assentamento em larvas de ostras e de outros moluscos (Coon e Bonar, 1986; Coon *et al.*, 1990; Beiras e Widdows, 1995; García-Lavandeira *et al.*, 2005; Teh *et al.*, 2012).

Em hatcheries para que o assentamento em larvas de ostras seja promovido, são geralmente usados diversos estímulos. Para além de haver um controlo das condições ambientais, adicionam-se ainda alguns dos referidos estímulos artificiais. Uma prática muito comum em hatchery é a colocação das larvas “olhadas” num refrigerador a fim de retardar a etapa de assentamento (visto que o metabolismo das larvas diminui), para posteriormente lhes ser fornecido os devidos estímulos (ditos naturais e artificiais) (Helm e Bourne, 2004).

Um aspeto muito importante no assentamento de larvas de ostras em hatchery refere-se ao substrato a ser utilizado. Na escolha do substrato deve-se ter em conta dois parâmetros essenciais: a adequação ao assentamento das larvas e se é de fácil o manejo posterior das sementes. Os materiais utilizados como substrato para o assentamento de larvas de ostras são da mais diversa natureza. Podem ser desde placas de PVC, pó de concha de ostra moída (com dimensões de granulometria compreendidas entre 250 µm e

<sup>3</sup> Estes dois aspetos que permitem entender quando é que as larvas estão prontas a assentar foram aprendidos durante o trabalho desenvolvido no LMM.

500 µm), cordas/bolsas com conchas de ostras presas e materiais de plástico ou cerâmicos revestidos com cimento (sendo os dois últimos utilizados em grandes tanques de assentamento) (Helm e Bourne, 2004).

Uma técnica importante relativa à produção de sementes é a técnica de assentamento remoto. O assentamento remoto consiste numa técnica mais económica de assentamento de larvas “olhadas”. Esta técnica difere da tradicional técnica de assentamento na medida em que, em vez de ser praticada na hatchery, esta é praticada no local de cultivo das ostras, ou próximo. Assim as larvas e posteriormente as sementes, bem como as ostras adultas, alimentam-se da matéria orgânica e inorgânica existente no local de cultivo ao invés de serem alimentadas com microalgas na hatchery. Assim esta técnica permite reduzir os custos de produção (Júnior *et al.*, 2006).

### 1.3. Objetivos

Tendo em conta o interesse comercial da ostra *C. gasar* no Brasil e a necessidade de otimizar a sua produção, diversos estudos são requeridos. Desta forma e a par de outras etapas do ciclo produtivo desta espécie em laboratório, a etapa de assentamento desempenha especial interesse.

Neste trabalho pretende-se estudar o efeito de três salinidades (20‰, 27‰ e 35‰) e de duas temperaturas (temperatura ambiente de aproximadamente 24°C e 28°C) sobre o rendimento de assentamento da ostra *C. gasar*, em escala de produção, atendendo as necessidades e condições do LMM.

## 2. Materiais e Métodos

O ensaio de assentamento de *C. gasar* sobre diferentes condições de salinidade e temperatura teve a duração de 26 e 27 dias, respetivamente. O ensaio referente à salinidade teve início em 16 de Março de 2012 (sendo concluído a 11 de Abril de 2012) e o ensaio de temperatura teve início em 19 de Março de 2012 (sendo concluído a 16 de Abril de 2012).

Para a obtenção das larvas de *Crassostrea gasar* aptas (larvas olhadas) ao assentamento neste trabalho, foi necessário a prévia realização de diversas etapas. Estas etapas incluem a indução da desova de animais reprodutores e respetiva larvicultura. Foram utilizados reprodutores de *C. gasar* com idades compreendidas entre 2 e 3 anos, provenientes do Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina em Florianópolis, Brasil (27° 35' 0.93"S, 48° 26' 28.51"W).

## 2.1. Desova

Para a realização da desova foram utilizadas 185 ostras, seguindo o método de indução por choque térmico, de acordo com o esquema seguinte:

---

### Indução da desova da ostra *C. gasar*

---

1. Limpar cada animal individualmente. Esta limpeza consiste em raspar as conchas com auxílio de um cutelo a fim de retirar todas as incrustações e posteriormente escovar cada animal utilizando água doce.
2. Higienizar os animais, imergindo-os num recipiente contendo solução de água doce com cloro ativo (NaClO) a 25‰, durante 1 hora.
3. Neutralizar o cloro ativo adicionando tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ). Retirar os animais da solução e enxaguá-los com água doce seguida de água do mar.
4. Acondicionar os animais em local de desova, durante 1 hora à temperatura ambiente e com fluxo contínuo de água do mar<sup>4</sup> (filtrada com UV – fluxo de aproximadamente 10 litros por minuto).
5. Iniciar alternância entre ciclos de 20 minutos entre imersão dos animais em água do mar à temperatura ambiente com fluxo contínuo com 3 minutos de exposição ao ar. Após cada ciclo, inicia-se um novo com o aumento de 2°C na temperatura (até um máximo de 28°C). Assim que os animais começarem a desovar não se deve aumentar mais a temperatura.
6. Separar os animais que desovarem em um recipiente a fim de identificar o sexo, através de uma amostra de gâmeta expelido e auxílio de microscópio. Juntar os gâmetas de todas as fêmeas que desovarem em solução, efetuar o mesmo para os machos.
7. Terminar os ciclos de indução. Acondicionar os animais em lanternas (higienizadas com cloro 150‰, seguido de água doce e neutralizado com tiosulfato de sódio e enxaguado com água do mar).
8. Transferir os animais para o tanque de desova/larvicultura, contendo água do mar à temperatura de 26-28°C com fraca aeração.
9. Adicionar 1 litro da solução concentrada de gâmeta feminino no tanque de desova/larvicultura a cada 20 minutos. Efetuar este procedimento 3 vezes para os gâmetas femininos e masculinos.
10. Após 24 horas, retirar os animais e esvaziar o tanque de desova/larvicultura. Na saída do tanque colocar peneiras com telas de diâmetro de 120, 55 e 35 µm (umas dentro das outras, de cima para baixo), a fim de reter as larvas e sujidade.
11. Juntar as larvas retidas na tela de diâmetro de 55 µm num recipiente. Concentrar as larvas num volume conhecido (exemplo: 12 litros), homogeneizar e com auxílio de uma pipeta retirar 3 amostras de 0,5 ml, para quantificação de larvas D.

---

<sup>4</sup> Toda a água do mar utilizada no LMM é filtrada com UV.

## 2.2. Larvicultura

A larvicultura ocorreu num tanque de 20.000 litros (onde o volume utilizado foi de 15.000) em sistema de cultura estático (batch). A salinidade de 27‰ foi mantida constante ao longo da larvicultura. A cada 24 horas e durante toda a larvicultura procedeu-se do seguinte modo:

- Esvaziamento do tanque, colocando as peneiras para retenção das larvas nas saídas do mesmo;
- Higienização do tanque com solução de limão “tahiti” (*Citrus aurantifolia*)<sup>5</sup>;
- Adição de 3.500 litros de água doce e perfazer até aos 15.000 litros com água do mar e alimento;
- Colocar as larvas no tanque;

Na alimentação foram fornecidos diferentes tipos de microalgas unicelulares. A concentração inicial de microalgas foi de  $2,0 \times 10^4$  células/ml (no volume final de 15.000 litros) composta pela seguinte proporção:  $1 \times 10^4$  células/ml de *Isochrysis sp.*,  $0,6 \times 10^4$  células/ml de *Chaetoceros muelleri* e  $0,4 \times 10^4$  células/ml de *Pavlova sp.*. A densidade e concentração final de microalga foi gradualmente alterada ao longo da larvicultura, de forma a adequar-se melhor às necessidades nutricionais das larvas e também devido à disponibilidade diária da produção das espécies de microalga pelo setor de produção das mesmas do LMM (consultar tabela 12, anexo II).

Ao longo dos últimos dias de larvicultura, as larvas aptas para assentamento foram sendo retiradas com auxílio de uma peneira com diâmetro de malha de 230  $\mu\text{m}$ . Nos últimos dias de larvicultura foram também selecionadas para assentamento larvas retidas em peneira com 210  $\mu\text{m}$  de diâmetro de malha. A medida em que se foi obtendo larvas aptas para assentamento, procedia-se ao acondicionamento das mesmas numa refrigeradora a 11°C com o intuito de reduzir o metabolismo e consequentemente diferindo o assentamento. Este acondicionamento das larvas foi efetuado por um período de tempo de 48 e de até 72 horas, no experimento de efeito da salinidade e temperatura, respetivamente, até se obter a quantidade certa de larvas para assentar.

A quantidade de larvas aptas para assentamento foi obtida por estimativa de peso<sup>6</sup>. Previamente pesou-se um pedaço de tela de diâmetro inferior a 230  $\mu\text{m}$ . As larvas foram então envolvidas no respetivo pedaço de tela e retirou-se o excesso de água por absorção

<sup>5</sup> Esta solução é obtida a partir de dois limões de tamanho médio, batidos em liquidificador. O suco resultante é peneirado e diluído em cerca de 3 litros de água doce.

<sup>6</sup> A 1 g contém cerca de 57.000 larvas (dados padronizados pelo LMM).

com papel toalha. Por fim efetuou-se a pesagem das larvas e descontou-se o peso do pedaço de tela.

## **2.3. Assentamento**

### **2.3.1. Composição dos Sistemas de Assentamento**

No assentamento das larvas, a fim de se testar o efeito de salinidade e temperatura, executou-se dois sistemas diferentes. O sistema utilizado no ensaio da salinidade foi constituído por 6 baldes de 20 litros com fundo de tela de diâmetro de malha de 190  $\mu\text{m}$ , colocados em um tanque de 1.500 litros. Já o sistema para o ensaio de temperatura foi constituído por 6 cilindros de 170 litros com fundo de tela com diâmetro de malha de 200  $\mu\text{m}$ , colocados em tanques de 1.800 litros. Cada tratamento de cada ensaio conteve 6 réplicas. Sendo assim no caso do ensaio de salinidade, para cada uma das salinidades testadas (20, 27 e 35‰) foram colocados 6 baldes em um tanque de 1.500 litros. Assim para este ensaio totalizou-se 18 baldes e 3 tanques de 1.500 litros. No ensaio de temperatura, foram utilizados 6 cilindros por tratamento (temperatura ambiente e de 28°C), mas cada conjunto de 3 cilindros foi colocado em tanques de 1.800 litros. Assim sendo, neste ensaio totalizou-se 12 cilindros e 4 tanques de 1.800 litros (consultar figura 8 e 9, do anexo I).

Em ambos os sistemas utilizados, os baldes e cilindros foram acondicionados nos respetivos tanques com sistema fechado de circulação de água e alimento designado por “Sistema Air Lift”. Este sistema baseia-se na elevação de água por injeção de ar, através de um sistema de mangueiras e tubos de PVC de pequeno diâmetro. Desta forma, a água corre por meio de furos nos tubos de PVC para os respetivos baldes e cilindros.

Para que no ensaio de efeito da temperatura sobre o assentamento se conseguisse obter uma temperatura constante de 28°C foram colocados, em cada um dos 2 tanques de 1.800 litros correspondentes a este tratamento, 4 aquecedores com termostato de 300W (Atman) de potência, cada um, e regulados para a temperatura de 28°C. Para além disso, em cada um dos tanques deste ensaio foi colocado um termómetro de mercúrio, a fim de manter um registo contínuo e calibrado da temperatura ao longo de todo o ensaio.

Previamente ao assentamento das larvas, efetuou-se o cálculo da água doce necessária para adicionar aos tanques, a fim de se obter as salinidades desejadas (20, 27 e 35‰). Desta forma, marcou-se nos tanques de cada tratamento o volume de água doce necessária

### 2.3.2. Povoamento dos Sistemas de Assentamento com as Larvas

Para o ensaio do efeito de diferentes salinidades sobre o assentamento de *C. gasar*, povoou-se cada um dos 18 baldes com cerca de 187.000 larvas. No ensaio relativo à temperatura, cada um dos 12 cilindros foi povoado com cerca de 573.372 larvas. Após retirar as larvas do refrigerador, estas foram deixadas durante cerca de uma hora à temperatura ambiente, a fim de aclimatarem-se. Após esse período, as larvas foram submetidas a um tratamento com epinefrina ( $C_9H_{13}NO_3C_4H_6O_6$  – Sigma Co.) para estímulo ao assentamento. As larvas foram colocadas em solução de epinefrina durante 3 horas. A solução de epinefrina foi preparada do seguinte modo: dissolveu-se 0,33 g de epinefrina em 1 litro de água destilada, posteriormente diluiu-se a solução em água do mar na proporção de 1:9 (concentração final de  $1,1 \times 10^{-4}$ ).

Aquando do povoamento das larvas nos respetivos recipientes de assentamento, foi adicionado 33 g de pó de concha nos baldes (previamente peneirado de modo a conter uma dimensão granulométrica compreendida entre 230 e 390  $\mu m$ , e tratado com solução de cloro a 15‰ seguido de lavagem com água doce e salgada, respetivamente) e 50 g nos cilindros.

Durante o povoamento das larvas e com o objetivo de se obter a mesma quantidade de larvas em todos os baldes e cilindros, procedeu-se conforme o abaixo descrito para cada um dos ensaios (salinidade e temperatura). Após o tratamento com epinefrina (no qual as larvas se encontravam todas juntas), enxaguou-se as larvas com água do mar e dilui-se as mesmas em um balde contendo 15 litros de água também do mar. Com auxílio de um gobelé de 500 ml distribui-se as larvas em cada um dos baldes/cilindros tendo o especial cuidado de se homogeneizar a “solução” de larvas a cada vez que se enchia novamente o gobelé. Assim que cada balde/cilindro recebeu 500 ml de “solução” de larvas, efetuou-se nova diluição com as restantes larvas em 15 litros de água do mar e novamente com o gobelé transferiu-se mais 500 ml para cada balde/cilindro. Procedeu-se desta forma durante 4 ciclos, garantindo que cada balde/cilindro recebeu igual número de gobelés com “solução” de larvas na mesma diluição.

Após 48 horas do povoamento efetuou-se novo tratamento de epinefrina. Contudo desta vez não se juntou as larvas. Assim cada uma das réplicas de cada ensaio (previamente identificadas nos baldes e cilindros) foi colocada durante 3 horas em banho de solução contendo epinefrina, como descrito anteriormente.

### 2.3.3. Manejo dos Tanques de Assentamento

A verificação da temperatura em ambos os ensaios foi efetuada três vezes ao dia. A primeira ao início do dia e antes do manejo diário do experimento, a segunda após 30 minutos decorridos do manejo diário e a última por volta das 16 h. O registo da salinidade foi

efetuado todos os dias após 30 minutos decorridos do manejo com auxílio de um densitómetro. Excetuando no tratamento com água a 28°C, em todos os restantes tratamentos a água do mar utilizada encontrava-se à temperatura ambiente. Relativamente ao ensaio de temperatura, a salinidade foi regulada para 27‰.

A alimentação<sup>7</sup> ao longo de todo o tempo de ocorrência do experimento consistiu na adição de duas espécies de microalgas, *Isochrysis sp.* e *Chaetoceros muelleri* à densidade de  $6 \times 10^4$  células/ml, na proporção de 30% e 70% respetivamente (que em células/ml resulta:  $1,8 \times 10^4$  células/ml e  $4,2 \times 10^4$  células/ml, respetivamente).

Ao longo do experimento e para cada um dos ensaios (salinidade e temperatura) a cada 24 horas efetuou-se a troca de água dos tanques, lavagem das larvas e posteriormente sementes, alimentação entre outras tarefas, seguindo o esquema seguinte para ambos os ensaios:

#### Manejo Diário do Assentamento

1. Medir e registar a temperatura de cada tanque;
  - Desligar os aquecedores, no caso do tratamento de temperatura a 28°C;
2. Esvaziar tanques e lavar sementes com água do mar com pouca pressão;
3. Adição de água doce até à marca correspondente de cada tanque;
4. Adição de tiosulfato de sódio (para neutralização do cloro presente na água doce);
  - 2,5 g em cada um dos tanques do ensaio temperatura;
  - 3 g no ensaio salinidade e tratamento 20‰;
  - 2 g no ensaio salinidade e tratamento 27‰;
5. Adição de água do mar, deixando espaço para a adição de alimento;
  - No caso do tratamento de 28°C ligar o sistema de aquecimento de água, a fim de encher o tanque já com a temperatura indicada;
6. Adição de alimento e preenchimento do restante volume com água do mar;
  - Voltar a ligar os aquecedores, no caso do tratamento com temperatura de 28°C;
7. Registar temperatura e salinidade;

## 2.4. Avaliação do Rendimento do Assentamento

Ao longo do experimento foram efetuadas duas avaliações do rendimento do assentamento. Esta avaliação consiste na contagem das sementes para cada réplica. No

<sup>7</sup> A quantidade diária de alimento dado baseava-se na fórmula:  $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ . No qual “ $C_1$ ” corresponde à concentração necessária de cada uma das espécies de microalga ( $1,8$  e  $4,2 \times 10^4$  células/ml); “ $V_1$ ” corresponde ao volume total utilizado de cada tanque de cada ensaio (salinidade – 1.500 litros; temperatura – 1.800 litros); “ $C_2$ ” corresponde a concentração diária de cada espécie de microalga (valor à responsabilidade do sector de microalgas do laboratório); “ $V_2$ ” corresponde ao volume a adicionar de cada uma das espécies de microalga.

experimento de salinidade a primeira avaliação foi efetuada após 13 dias decorridos do assentamento e no experimento de temperatura foi efetuada após 15 dias. A segunda avaliação foi realizada aquando do final de cada um dos experimentos.

Para cada uma das réplicas de cada tratamento, realizou-se o peneiramento individual com recurso a peneiras de diâmetro de malha de 1 mm, 750 µm, 500 µm e 390 µm. Com recurso a uma proveta, procedeu-se ao preenchimento da mesma com as sementes retidas em cada uma das telas. Assim obtinha-se o “volume” total de sementes em cada malha. Para se obter a quantidade de sementes no “volume” registado na proveta, retirou-se 3 amostras de cada um dos tamanhos de malhas. Para a peneira de diâmetro de malha 1 mm, retiraram-se amostras com 0,5 ml, medidos num tubo eppendorf. Para as malhas de 750 e 500 µm as amostras retiradas foram de 0,2 ml, também medidas em tubo eppendorf. Com auxílio de uma lupa binocular fez-se a contagem do total de sementes em cada uma das amostras.

As sementes retidas na peneira de diâmetro de malha de 390 µm por serem demasiado pequenas para contagem, foram repostas nos respetivos baldes/cilindros a fim de crescerem e serem contadas na última avaliação. Na segunda e última avaliação procedeu-se da mesma forma. As sementes retidas nas restantes malhas (1 mm, 750 e 500 µm) após contagem foram encaminhadas para o setor de produção do LMM.

Para o cálculo do rendimento total do assentamento de cada réplica, por tratamento, calcula-se primeiramente a quantidade total de sementes retidas, nas diferentes peneiras, para cada um dos tamanhos de malha, segundo a seguinte fórmula:

$$Q. T. = \frac{\bar{x} \text{ amostra} \times \text{“Volume” total}}{\text{“Volume” da amostra}}$$

- Q. T. equivale ao valor total de sementes retidas na peneira;
- $\bar{x}$  amostra equivale à média das 3 amostras;
- “Volume” total corresponde ao volume total de sementes retidas na peneira;
- “Volume” da amostra corresponde ao volume utilizado nas amostragens de sementes de 1 mm, 750 e 500 µm;

Assim para se obter o valor da taxa de rendimento em cada réplica, calcula-se o somatório do valor total de sementes obtidas em cada peneira (1 mm, 750 e 500 µm) e divide-se esse valor, pelo número de larvas colocadas no respetivo balde/cilindro.

## 2.5. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do software Excel © e do Statgraphics Centurion XVI. A homogeneidade dos dados foi verificada com a aplicação do



teste de Levene. Aplicou-se a análise de variância *One Way* ANOVA para verificar se houve diferenças significativas no rendimento do assentamento entre tratamentos. A análise de variância (*One Way* ANOVA) foi também aplicada para verificar a ocorrência (ou não) de diferenças significativas nas médias de temperatura entre tratamentos e num mesmo tratamento. Pois no ensaio de temperatura cada conjunto de 3 réplicas (relembrando que cada tratamento continha 6 réplicas) encontrava-se em tanques diferentes, assim serviu esta análise para verificar se a temperatura num mesmo tratamento não apresentou diferenças significativas. De seguida, aplicou-se o teste Fisher's LSD que permitiu identificar, com precisão, as diferenças e/ou igualdades entre os grupos de dados analisados. Todas as análises foram efetuadas com um nível de significância de 0,05.

### 3. Resultados

#### 3.1. Larvicultura

Ao fim de 24 horas após a desova, foram contabilizadas 42.560.000 larvas D. A larvicultura ocorreu ao longo de 25 dias, ao fim dos quais, foram obtidas 11.764.800 larvas aptas para assentarem. A temperatura média durante a larvicultura foi de  $25,87^{\circ}\text{C} \pm 1,07$ . A partir do vigésimo dia de larvicultura começaram a ser obtidas as primeiras larvas aptas para assentamento. Na tabela 1 encontra-se a quantidade de larvas aptas para assentamento desde o vigésimo dia de larvicultura até ao vigésimo quinto e a respetiva correspondência à peneira em que foram retidas. Só a partir do penúltimo dia de larvicultura as larvas retidas na peneira de diâmetro de malha 210  $\mu\text{m}$  foram consideradas aptas para assentamento. Isto porque antes desse momento, foram repostas no tanque de larvicultura a fim de crescerem um pouco mais.

Tabela 1: Quantidade de larvas aptas para assentamento e respetivas dimensões, obtidas ao longo dos últimos 5 dias de larvicultura.

Dia de larvicultura decorrido	Quantidade de larvas aptas para assentamento	
	230 $\mu\text{m}$	210 $\mu\text{m}$
20 <sup>o</sup>	1.801.770	-----
21 <sup>o</sup>	3.082.560	-----
22 <sup>o</sup>	2.598.630	-----
23 <sup>o</sup>	531.240	-----
24 <sup>o</sup>	983.828	1.849.650
25 <sup>o</sup>	-----	917.130
<b>TOTAL</b>	11.764.800	

As larvas utilizadas no experimento referente à salinidade foram as larvas obtidas no vigésimo e vigésimo primeiro dia de assentamento. As restantes larvas foram utilizadas no experimento de temperatura e para produção do LMM.

### 3.2. Parâmetros Físico-químicos

No experimento do efeito da salinidade sobre o assentamento de *C. gasar* a média de salinidade de cada um dos tratamentos foi a seguinte: 20,11‰ ± 0,70, 28,28‰ ± 0,42 e 35,70‰ ± 0,44. A média do valor da salinidade de cada tratamento equivale, aproximadamente, aos valores de salinidade desejados. Apenas o valor médio de 28,28‰ para a salinidade correspondente de 27‰ supera um pouco, contudo não é significativo para este parâmetro físico-químico (salinidade). A temperatura média obtida em cada um dos tratamentos, 20‰, 27‰ e 35‰ foi de 24,36°C ± 1,87, 24,46°C ± 1,73 e 24,50°C ± 1,76, respetivamente. Verificou-se que não houve diferenças significativas entre as médias de temperatura de cada tratamento ( $P < 0,05$ ).

Para o experimento do efeito da temperatura sobre o assentamento, a média de temperatura de cada um dos tanques de cada tratamento foi a seguinte: 27,15°C ± 1,15, 27,29°C ± 0,96, 24,09°C ± 2,42 e 24,46°C ± 1,14, sendo que as duas primeiras médias de temperatura correspondem aos tanques de temperatura pretendida de 28°C e as outras duas aos tanques do tratamento de temperatura ambiente. Não se verificou diferenças significativas entre as médias de temperatura de tanques de um mesmo tratamento ( $P \geq 0,05$ ), como seria de esperar. As médias dos valores de salinidade neste ensaio foram: 26,81‰ ± 0,50, 27,07‰ ± 0,51, 26,52‰ ± 0,64 e 26,65‰ ± 0,60, sendo que as duas primeiras médias correspondem aos tanques do tratamento de temperatura 28°C e as duas outras médias aos tanques de tratamento de temperatura ambiente.

A temperatura de 28°C não foi obtida como desejado, contudo quando comparadas as médias aproximadas de 27°C nos dois tanques do referido tratamento, estas são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) das médias do tratamento de temperatura ambiente.

### 3.3. Rendimento do Assentamento

Os valores de rendimento do assentamento obtidos em cada um dos dois ensaios, temperatura e salinidade, estão apresentados na tabela 2 e 3 respetivamente, assim como a quantidade de sementes obtidas em cada um dos tratamentos e respetivas réplicas.

Da análise da tabela 2 observa-se que a quantidade de sementes obtidas e consequentemente o rendimento do assentamento foi superior no tratamento de temperatura de 28°C. A maior taxa de rendimento (17,01%) foi também observada no

referido tratamento. Por outro lado a menor taxa de rendimento (5,95%), ocorreu no tratamento de temperatura ambiente.

Tabela 2: Rendimento do ensaio do efeito da temperatura (temperatura ambiente e temperatura de 28°C) no assentamento da ostra *C. gasar*.

Tratamento	Réplica	Quantidade de Sementes	Rendimento (%)
Temperatura Ambiente	1	70.514	12,30%
	2	69.029	12,04%
	3	34.111	5,95%
	4	63.247	11,03%
	5	39.743	6,93%
	6	58.015	10,12%
Temperatura 28°C	1	65.593	11,44%
	2	66.467	11,59%
	3	97.537	17,01%
	4	80.375	14,02%
	5	76.791	13,39%
	6	90.799	15,84%

Tabela 3: Rendimento do ensaio do efeito da salinidade (20, 27 e 35‰) no assentamento da ostra *C. gasar*.

Tratamento	Réplica	Quantidade de Sementes	Rendimento (%)
20‰	1	65.077	34,80%
	2	71.986	38,50%
	3	79.676	42,61%
	4	87.191	46,63%
	5	81.381	43,52%
	6	72.802	38,93%
27‰	1	58.451	31,26%
	2	58.204	31,13%
	3	69.906	37,38%
	4	52.116	27,87%
	5	48.387	25,88%
	6	52.424	28,03%
35‰	1	29.504	15,78%
	2	19.872	10,63%
	3	29.825	15,95%
	4	13.216	7,07%
	5	20.417	10,92%
	6	24.735	13,23%

Uma análise da tabela 3 permite verificar que o tratamento com salinidade de 20‰ é o que apresenta maiores taxas de rendimento e ainda que, a maior taxa de rendimento (46,63%) verifica-se também neste tratamento. Já o tratamento com salinidade de 35‰ é o que apresenta as menores taxas de rendimento e também o que apresenta a mais baixa taxa de rendimento (7,07%) deste ensaio.

### 3.4. Análise Estatística do Rendimento do Assentamento

Pela análise das tabelas 4 e 5, conclui-se que a análise de variância *One Way* ANOVA em ambos os ensaios (temperatura e salinidade) revelou diferenças significativas entre os diferentes tratamentos para um nível de significância de 0,05.

Tabela 4: Análise de variância do efeito da temperatura no assentamento da ostra *C. gasar*.

Origem de Variação	df	SS	MS	F	P
Entre Grupos	1	51,75	51,75	8,49	0,0155
Dentro de Grupos	10	61,01	6,10		
Total	11	112,76			

df= graus de liberdade; SS= soma dos quadrados; MS= quadrado médio;

Tabela 5: Análise de variância do efeito da salinidade no assentamento da ostra *C. gasar*.

Origem de Variação	df	SS	MS	F	P
Entre Grupos	2	2503,53	1251,77	81,60	0,000
Dentro de Grupos	15	230,10	15,34		
Total	17	2733,63			

df= graus de liberdade; SS= soma dos quadrados; MS= quadrado médio;

No ensaio do efeito da temperatura sobre o assentamento de *C. gasar*, verifica-se no tratamento de temperatura 28°C uma taxa média de rendimento do assentamento (13,89%) superior à média observada no tratamento de temperatura ambiente (9,73%). Relativamente ao ensaio do efeito da salinidade sobre o assentamento de *C. gasar*, observa-se uma taxa média de rendimento de assentamento maior (40,83%) no tratamento com salinidade 20‰ em comparação com os restantes tratamentos. Neste ensaio verifica-se também que para a salinidade de 35‰, a taxa média de rendimento do assentamento foi a menor (12,26%). Da análise do teste Fisher's LSD ( $P < 0,05$ ) observam-se diferenças significativas entre todos os tratamentos no ensaio da salinidade, (tabela 6).

Tabela 6: Média do rendimento (%) do assentamento no ensaio do efeito da salinidade sobre o assentamento da ostra *C. gasar*.

Tratamento	Réplicas	Média
20‰	6	40,83a ± 4,23
27‰	6	30,26b ± 4,06
35‰	6	12,26c ± 3,42

Os valores são médio ± desvio padrão. Para cada linha, os valores seguidos por letras diferentes são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

## 4. Discussão

Os resultados do presente estudo demonstraram que a temperatura e a salinidade influenciam muito o assentamento da ostra *Crassostrea gasar*. As maiores taxas de rendimento do assentamento foram registadas na salinidade mais baixa (20‰) e na temperatura mais elevada (cerca de 27°C). Verifica-se também que com o diminuir da salinidade as taxas de assentamento aumentaram. Estes resultados estão de acordo com outros resultados obtidos para diversas espécies de ostras tropicais do género *Crassostrea*.

De acordo com Devakie e Ali (2000) que, estudaram o efeito de seis salinidades diferentes (5, 10, 15, 20, 25 e 30‰) no assentamento da ostra *Crassostrea iredalei*, concluiu-se que para esta espécie a melhor salinidade durante a fase de assentamento é a de 20‰, com uma taxa de rendimento médio de assentamento de 31,4%. O valor da taxa de rendimento médio de assentamento para a mesma salinidade, no presente estudo com a espécie *C. gasar*, foi cerca de 40,83%. Estes autores relataram ainda que para salinidades mais baixas (nomeadamente 15‰, em condições de temperatura semelhantes às testadas no presente estudo) a taxa de rendimento de assentamento diminui consideravelmente. Por outro lado Tan e Wong (1996) num estudo efetuado sobre o efeito da salinidade no assentamento da ostra *Crassostrea belcheri*, obtiveram melhores taxas de assentamento na salinidade 18‰ (38,6%) e na salinidade de 12‰ (35,8%). Neste estudo para a espécie *C. gasar*, verificaram-se maiores taxas de rendimento de assentamento, na medida em que a salinidade diminuía. Segundo Pereira e colaboradores (2001) esta espécie desenvolve-se bem em salinidades que podem chegar a 8‰, depreende-se desta forma, que para se obter a melhor salinidade aquando do assentamento desta espécie, devem-se testar salinidades inferiores às já testadas neste estudo (por exemplo: 15, 10 e 5‰).

Das temperaturas testadas, obteve-se melhores taxas de rendimento de assentamento na temperatura de 27°C. Contudo essas taxas foram baixas (média de 13,89%), quando comparadas com os resultados de Rico-Villa (2009) e colaboradores que, para a mesma temperatura para a espécie *Crassostrea gigas*, descrevem uma taxa de rendimento de

assentamento de 87%. Devakie e Ali (2000) ao estudarem o efeito de diferentes temperaturas em combinação com diferentes salinidades no assentamento da ostra *Crassostrea iredalei* mostraram que a temperatura de 30°C foi a que surtiu melhor efeito no assentamento (31,4%). Contudo, no estudo destes autores, esta temperatura revelou ser a mais indicada para o assentamento da referida espécie, mas em combinação com uma salinidade de 20‰. Salienta-se ainda nesse estudo que, para a temperatura de 27°C, as melhores taxas de assentamento foram obtidas na salinidade de 25‰ (16,9%).

## 5. Conclusão

Os resultados do presente estudo vêm dar um importante contributo para a produção comercial da ostra *Crassostrea gasar*. Verificou-se que na fase de assentamento das larvas desta espécie a salinidade de 20‰ á temperatura de 24°C e a temperatura de 27°C na salinidade de 27‰ são as mais indicadas.



## CAPÍTULO 3

Indução da Desova da Ostra *Crassostrea gigas*  
(Thunberg, 1795)





# 1. Introdução

## 1.1. Aspetos Reprodutivos das Ostras

O sistema reprodutivo das ostras é composto por um tecido misto que inclui tecido de armazenamento, fibras musculares lisas e de hemócitos circulantes que rodeiam o sistema digestivo (Dheily *et al.*, 2012). Esses tecidos, que compõem as gónadas, são constituídos por canais muito ramificados e/ou por folículos, revestidos no seu interior por cílios (Helm e Bourne, 2004). O tecido da gonada primária é constituído por células germinativas localizadas nas paredes dos folículos, que posteriormente por diferenciação darão origem aos gametas (Helm e Bourne, 2004; Dheily *et al.*, 2012).

O ciclo reprodutivo das ostras inicia-se com a ativação do tecido que forma as gónadas, o que inclui a gametogénese, ativação dos gametas e termina na desova (libertação dos gametas) (Ramos, 2011). São considerados, essencialmente, cinco estágios no ciclo reprodutivo das ostras: o estágio 0 ou imaturo, que corresponde ao estágio inicial da gametogénese. Neste estágio as células de armazenamento acumulam glicogénio, que posteriormente será usado como fonte de energia para a produção de gametas. Nesta fase não se encontram gametas masculinos ou femininos diferenciados. Alguns autores consideram que o estágio após a desova corresponde a este estágio (Le Dantec, 1957 e 1968; Marteil, 1976, retirado de Lango-Reynoso *et al.*, 2000). Devido à grande quantidade de reservas de glicogénio, nesta fase as ostras são mais comercializáveis; estágio 1 ou gametogénese, neste estágio os folículos desenvolvem-se e as células que os compõem iniciam a produção de gametas (masculinos e femininos). Nesta fase já é possível identificar o sexo das ostras; estágio 2, neste estágio as gónadas encontram-se em multiplicação, com o aumento da quantidade de gametas e com a redução das reservas de glicogénio; estágio 3 ou de maturação, as gónadas encontram-se completamente “cheias” de gametas totalmente desenvolvidos. Microscopicamente diferenciam-se facilmente os machos das fêmeas, e no caso das fêmeas pode-se observar alguns óvulos livres, após desprenderem-se das paredes dos folículos; estágio 4 ou desova corresponde à fase na qual ocorre a libertação dos gametas. As gónadas diminuem de dimensão e ganham uma aparência transparente. Esta fase, na espécie *Crassostrea gigas*, ocorre durante os meses de verão, sendo que as restantes fases ocorrem ao longo dos meses de inverno (Solon, 1984; Lango-Reynoso, *et al.*, 2000; AquaBio Consultants *Ltd*, 2006; Dheily *et al.*, 2012).

O desenvolvimento do sistema reprodutivo das ostras e a ocorrência dos diferentes estágios dependem de diversos fatores, no entanto, dois fatores são de maior relevância, a temperatura e a disponibilidade e qualidade do alimento (Helm e Bourne, 2004; Ramos, 2011). Na espécie *Crassostrea gigas* a gametogénese é ativada a temperaturas que rondem

os 12°C. Contudo dependendo da localização as temperaturas de ativação dos diferentes estágios que compõe o ciclo reprodutivo das ostras, podem variar, mesmo dentro da mesma espécie. A quantidade e qualidade de alimento disponível resultam em uma menor ou maior quantidade de glicogénio armazenado e consequentemente afeta a produção dos gâmetas (Miossec, *et al.*, 2009).

Existem várias formas de avaliar o grau de desenvolvimento dos gâmetas em moluscos bivalves. Estas podem ser resumidas em cinco metodologias: a observação visual do tamanho, forma e cor das gónadas; o índice de condição, que consiste no estabelecimento da relação entre peso das gónadas e peso total do corpo (peso seco ou húmido); a medição do diâmetro médio dos óvulos; a análise histológica das gónadas (Lango-Reynoso *et al.*, 2000) e por estereologia (Afonso-Dias, 2007). Contudo todos os métodos apresentam vantagens e desvantagens, sendo que, não existe uma metodologia mais correta. Assim recomenda-se o uso de duas metodologias em simultâneo (Barber e Blake, 1991).

Atualmente as técnicas de acondicionamento de moluscos bivalves em laboratório permitem o controlo de diversos fatores importantes para o ciclo reprodutivo das ostras (tais como alimento, temperatura, salinidade, etc.) permitindo assim aos produtores e pesquisadores um fornecimento contínuo de ostras aptas a desovarem (Gomes, 2009; Ramos, 2011).

## 1.1. Indução da Desova em Moluscos Bivalves

A desova em moluscos bivalves, no meio ambiente, pode ser induzida por diversos fatores ambientais tais como: a temperatura, a salinidade, a luminosidade, as fases lunares, a concentração de oxigénio dissolvido na água, o pH, o movimento das correntes marinhas e outros estímulos físicos e a presença de certos componentes químicos na água (Aji, 2011). A indução da desova pode ainda ser estimulada pela presença de esperma na água ou pela combinação dos fatores acima mencionados (Helm e Bourne, 2004).

A indução da desova varia de espécie para espécie, e geograficamente, mesmo quando se considera uma mesma espécie. Por exemplo, na costa atlântica dos países europeus a ostra *Crassostrea gigas* inicia a desova a temperaturas acima de 18°C, sendo que a temperatura ótima encontra-se entre 21-22°C e nos países mediterrânicos quando a temperatura atinge 24-25°C (Miossec *et al.*, 2009). Por outro lado no estado de Santa Catarina no Brasil, a espécie *C. gigas* desova preferencialmente em alturas em que a temperatura ronda os 27°C. Contudo temperaturas superiores a 27°C podem inviabilizar os gâmetas desta espécie (Ferreira *et al.*, 2011).

Nas hatchery utilizam-se várias práticas de indução da desova e obtenção de gâmetas em moluscos bivalves. No que se refere à ostra *C. gigas* duas práticas são mais usuais, a indução por choque térmico e o “strip” das ostras. A técnica de indução da desova por choque térmico consiste, no acondicionamento de todas as ostras a utilizar numa desova, num local apropriado para tal e iniciar ciclos de alternância entre água fria e água mais quente (com um diferencial de cerca de 10°C) até as ostras iniciarem a desova. Estímulos adicionais como a adição de alimento ou esperma (obtido por strip de macho) podem ser aditados a fim de induzir as ostras a abrirem as valvas. A técnica de “strip” é usualmente aplicada em ostras do género *Crassostrea* e consiste na abertura e separação das duas valvas, o que implica como consequência o sacrifício dos animais, com auxílio de um objeto cortante (por exemplo uma faca ou lâmina do tipo gillette) cortam-se as gónadas dos animais várias vezes extraindo-se os gâmetas. Previamente deve-se identificar o sexo dos animais, que deve ser realizado logo após a abertura do animal. Ambas as técnicas constituem “ferramentas” bastante eficientes na indução da ostra *C. gigas* (Helm e Bourne, 2004).

A técnica de “strip” pode não ser tão eficaz quando comparada com técnicas de indução (Tureck, 2010), visto que, esta técnica pode provocar danos nos gâmetas masculinos (Devauchelle, *et al.*, 1998) ou nos gâmetas femininos (Solon, 1984). Porém devido à grande fertilidade verificada na ostra *C. gigas*, a técnica de “strip” constitui uma prática viável (Solon, 1984; Boudry, 2008; Miossec, 2009).

Outros métodos de indução da desova de moluscos bivalves são usuais na produção em hatchery ou são utilizados como metodologias experimentais e cifram-se na adição/injeção de substâncias neurotransmissoras ou hormonas sexuais e na diluição de substâncias químicas. Na bibliografia encontram-se referências acerca da aplicação de hidróxido de amónia (NH<sub>4</sub>OH), de cloreto de potássio (KCl) (Boudry, 2008) e serotonina (N<sub>2</sub>OC<sub>10</sub>H<sub>12</sub>) (Devauchelle *et al.*, 1998) como indutores da desova da ostra *C. gigas*. Todavia, não se encontra informação acerca da metodologia utilizada na aplicação dos mesmos.

De entre os indutores baseados na aplicação de hormonas sexuais Wang e Croll (2006), demonstraram que o estradiol induz a desova em ambos os sexos da vieira *Placopecten magellanicus* e que a testosterona apenas induz a desova nos machos. Estes autores verificaram ainda que a progesterona bloqueia a desova em ambos os sexos. A aplicação deste método baseia-se na injeção das respetivas hormonas nas gónadas dos animais (Wang e Croll, 2006; Velasco *et al.*, 2007)

O uso de serotonina como indutor químico neurotransmissor na desova de vieiras, de interesse comercial, tem-se demonstrado eficiente em diversas espécies, tais como:

*Nodipecten nodosus*, *Argopecten nucleus* (Velasco *et al.*, 2007), *Tridacna squamosa* (Neo *et al.*, 2011) e *Argopecten purpuratos* (Martinez *et al.*, 2007). Este indutor mostrou-se também eficaz na indução da desova da ostra *Crassostrea virginica* (Gibbons e Castagna, 1984). A aplicação de serotonina pode ser realizada por injeção nas gónadas ou no músculo adutor (Aji, 2011) ou por diluição na água (Devauchelle, *et al.*, 1998).

Qualquer um dos métodos aplicados por injeção pode ocasionar a morte do animal, quando mal aplicada a injeção, pois esta pode atingir as vísceras ou o coração (Aji, 2011).

Relativamente aos métodos com base no uso de substâncias químicas diluídas, o uso de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) foi pela primeira vez sugerido e patenteado por Morse e colaboradores (1977) como sendo um método fiável e barato para a indução da desova de moluscos bivalves, especialmente vieiras. Este método revelou-se também eficaz na indução da desova da ostra perliífera *Pinctada maxima* (Braley, 1998). Outro método de indução baseado na diluição de substâncias químicas, segundo Alagarswami e colaboradores (1980), consiste na adição de solução tampão tris, para ajuste do pH, que se mostrou eficaz na indução da desova da ostra perliífera *Pinctada fucata*.

Os métodos acima descritos podem ser utilizados individualmente ou em combinação com outro (s) método (s). Contudo deve-se examinar a qualidade do gâmeta expelido após a aplicação de alguns dos métodos, nomeadamente a serotonina, porque estes podem induzir a desova dos animais, independentemente de os gâmetas estarem ou não maduros (Aji, 2011).

### 1.3. Objetivos

Atendendo ao desenvolvimento dos programas de melhoramento genético da ostra *C. gigas* e de hibridização (entre as espécies *C. gasar*, *C. rhizophorae* e *C. gigas*) do Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina, os quais requerem a obtenção de gâmetas de cada animal individualmente, o presente estudo tem como objetivo desenvolver um método económico e eficiente de indução da desova individual de ostras. Desta forma testou-se a indução da desova individual da ostra *C. gigas* perante o efeito de cinco indutores combinados com choque térmico. O peróxido de hidrogénio nas concentrações de 3 mM e 6 mM, o efeito da exposição ao pH 9,1 e de 9,5 e o efeito da exposição ao esperma de *C. gigas* esterilizado.

## 2. Materiais e Métodos

O experimento de indução da desova da ostra *C. gigas* ocorreu no dia 26 de Abril de 2012. Foram utilizadas 162 ostras com cerca de 2 anos de idade e com peso médio de  $258,34g \pm 60,35$  e comprimento médio de  $13,56cm \pm 1,68$ . Os animais tiveram proveniência

do Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina em Florianópolis, Brasil (27° 35' 0.93"S, 48° 26' 28.51"W).

Cada tratamento (3 e 6 mM de peróxido de hidrogénio, pH 9,1 e 9,5, esperma esterilizado e controlo) conteve 27 animais, que foram divididos em 3 grupos de 9 animais, constituindo assim três réplicas por tratamento. A realização deste experimento seguiu a metodologia indicada por Morse e colaboradores (1977) (com algumas modificações) e a metodologia aplicada por Alagarswami e colaboradores (1980).

Previamente ao início do experimento retiraram-se 10 animais, para amostragem. Esta amostragem teve como objetivo analisar o desenvolvimento das gónadas para se poder inferir acerca do grau de maturação sexual dos animais, baseando-se na observação visual do tamanho, forma e cor das gónadas e da observação do sexo e desenvolvimento dos gametas através de microscópio.

## 2.1. Protocolo Experimental

O experimento foi realizado ao longo de duas etapas, uma inicial de água fria (20°C) de duração de duas horas e trinta minutos e outra etapa de água aquecida (26°C) com duração de três horas e trinta minutos, de acordo com a metodologia indicada por Morse e colaboradores (1977). Durante as duas etapas cada animal foi colocado num balde contendo 2 litros das soluções testadas à temperatura de 20 e 26°C. Por sua vez, os baldes contendo os animais e as soluções, foram colocados em banho-maria (às temperaturas correspondentes de cada etapa) em calhas. A salinidade neste experimento equivaleu à salinidade da água do mar, a aproximadamente 35‰, para todos os tratamentos.

A metodologia a aplicar variou consoante o indutor de desova a testar. Durante a etapa inicial, e de acordo com Morse e colaboradores (1977) os animais foram expostos às soluções de peróxido de hidrogénio (3 e 6 mM). Os restantes indutores foram aplicados durante a segunda etapa (pH 9,1 e 9,5 e esperma esterilizado). O tratamento controlo, consistiu apenas da exposição dos animais ao choque térmico, preconizado nas duas etapas.

Foram utilizadas 6 calhas, onde em cada uma se colocou 27 baldes contendo os animais. Os animais foram distribuídos aleatoriamente, em conjuntos de 9 animais por tratamento em cada calha. Logo, cada calha continha no máximo, 3 tratamentos (para melhor visualizar o esquema experimental indicado, consultar a imagem 10 e 11 no anexo I). Cada réplica foi constituída pelo grupo de 9 animais.

O preparo de cada uma das soluções de peróxido de hidrogénio e das soluções de pH foi realizada em tanques separadamente, de onde posteriormente se distribuiu para cada

um dos respetivos baldes previamente identificados contendo as ostras. Todas as soluções foram preparadas para um volume final de 60L.

Para a preparação das soluções de peróxido de hidrogénio (3 e 6 mM) partiu-se de uma solução concentrada 30% (Vetec Ltda.). Preparou-se 200 ml de solução peróxido de hidrogénio de concentração 3 mM e 6 mM diluindo-se 20 e 40 ml de peróxido 30% em 180 e 160 ml de água doce destilada, respetivamente. Cada uma das soluções foi adicionada em 60 L de água do mar à temperatura de 20°C.

Para a preparação da solução tampão Tris de concentração de 2M, dissolveu-se 24,2g de Tris em 75 ml de água destilada, ajustando-se posteriormente para um volume final de 100 ml. Para a obtenção das soluções de pH desejáveis 9,1 e 9,5 adicionou-se 4 ml e 12 ml de solução tampão Tris previamente preparada, por cada litro de água do mar tratada com U.V, respetivamente. Após adição da solução Tris 2M (240 e 720 ml aos tanques de contendo 60 litros de água do mar, do tratamento pH 9,1 e 9,5, respetivamente), com auxílio de um pHmetro (Alfakit Ltda.) confirmou-se o pH. Registou-se o pH de 9,11 e 9,49, em cada um dos tanques respetivos ao tratamento correspondente (pH 9,1 e 9,5). O pH registado da água do mar aquando deste experimento foi de 8,18.

Para a obtenção do esperma de *C. gigas* esterilizado, foram abertas 10 ostras separadamente. Com auxílio de uma lâmina tipo *gillette*, raspou-se uma pequena porção da gónada e colocou-se numa lâmina de microscópio. Observou-se o sexo dos animais em microscópio na objetiva de ampliação 30x. Separaram-se 4 machos e pelo método de stripping obteve-se a solução de gâmetas. Para esterilização da mesma, levou-se a solução ao micro-ondas durante 40 segundos à potência de 700 W. Posteriormente, com recurso ao microscópio na objetiva de ampliação 100x, verificou-se a ausência de movimento nos espermatozoides, concluindo-se assim que estes se encontravam “mortos”.

Este experimento seguiu a metodologia seguinte:

---

#### **Indução da Desova da Ostra *Crassostrea gigas***

---

1. Limpou-se cada animal individualmente. Esta limpeza consiste em raspar as conchas com auxílio de um cutelo a fim de retirar todas as incrustações e posteriormente escovou-se cada animal utilizando água doce.
2. Higienizou-se os animais, imergindo-os num recipiente contendo solução de água doce com cloro ativo (NaClO) a 25‰, durante 1 hora. Ao fim dessa hora, neutralizou-se o cloro ativo adicionando tiosulfato de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Posteriormente retiraram-se os animais da solução e enxaguaram-se com água doce seguida de água do mar.
3. Entretanto preparou-se as soluções de peróxido de hidrogénio 3 e 6 mM.
4. Retiraram-se 45 animais para realizar a biometria. Esta biometria consistiu do registro do peso e comprimento.

5. Colocou-se cada um dos animais nos respetivos baldes, que por sua vez foram colocados nas respetivas calhas, previamente sorteadas aleatoriamente e identificadas.
6. Iniciou-se a etapa 1 do procedimento de desova. Distribui-se 2 L de água do mar esterilizada com U.V à temperatura de 20°C por cada um dos baldes em todos os tratamentos. Para os tratamentos com peróxido de hidrogénio procedeu-se da mesma forma, mas com as respetivas soluções.
7. Preencheu-se cada uma das calhas com águas à temperatura de 20°C, até uma altura de 12 cm, aproximadamente.
8. Aguardou-se 2h e 30 min. Durante esse tempo observou-se e registou-se as ostras que foram desovando. De cada vez que ocorreu uma desova, colheu-se uma amostra de gâmeta em solução com auxílio de uma pipeta e procedeu-se à “sexagem”, com auxílio de um microscópico.
9. Durante esta etapa, procedeu-se à obtenção do gâmeta masculino esterilizado e à preparação das soluções de pH 9,1 e 9,5.
10. Após 2h e 30 minutos, retiraram-se as soluções dos baldes e enxaguou-se cada animal com água do mar à temperatura de 22°C. Para os animais que já haviam desovado, não se procedeu desta forma. Estes ficaram nas respetivas soluções até ao final do ensaio.
11. Iniciou-se a etapa 2 do procedimento. Nos tratamentos controlo, peróxido de hidrogénio (3 e 6 mM) e esperma esterilizado, distribui-se 2 L de água do mar a 22°C (esta foi a temperatura atingida, no entanto a desejada era de 26°C como já foi referido) por cada um dos baldes contendo o animal. Procedeu-se da mesma forma para o tratamento com as soluções de pH 9,1 e 9,5. Porém no tratamento com esperma esterilizado, posteriormente adicionou-se 1 ml da solução de gâmeta esterilizado em cada um dos baldes.
12. Aguardou-se 3h e 30 min. Procedeu-se da mesma forma como o descrito para a etapa 1. Ao fim desse tempo conclui-se o experimento.

## 2.2. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do software Excel © e do software Statgraphics Centurion XVI. A homogeneidade dos dados foi verificada com a aplicação do teste de Levene. Aplicou-se a análise de variância *One Way ANOVA* para verificar a ocorrência de diferenças significativas na média do número de ostras desovadas entre tratamentos.

Nos dados em que não se verificou homogeneidade aplicou-se as seguintes transformações de dados:  $\log(x)$ ,  $\arcsen(x)$ ,  $\arcsen(\sqrt{x})$ . Contudo a não homogeneidade dos dados manteve-se. Desta forma, procedeu-se à realização do teste não paramétrico Kruskal-Wallis para inferir acerca de diferenças significativas entre as médias percentuais de ostras macho e fêmea que desovaram entre tratamentos e diferenças significativas entre as

médias percentuais das ostras desovadas na etapa 1 e 2 do procedimento, entre tratamentos. Todas as análises foram efetuadas com um nível de significância de 0,05.

### 3. Resultados

Da amostragem de 10 animais para inferir acerca do estado de desenvolvimento das gónadas, verificou-se que apenas 50% dos mesmos se encontravam maduros, sendo que os restantes encontravam-se em estado de indiferenciação ou pouco maduros. Dos cinco animais maduros, três correspondiam a machos e os restantes dois a fêmeas.

#### 3.1. Análise Estatística da Indução da Desova

No tratamento com peróxido de hidrogénio 3mM e 6mM registou-se em cada um, uma ostra desovada não diferenciada. Estas ostras não foram classificadas como sendo macho ou fêmea, contudo foram contabilizadas no total de ostras desovadas nos respetivos tratamentos. O tratamento dos dados de percentagem quanto à proporção de ostras macho e fêmea e percentagem quanto à etapa de desova, refere-se apenas ao total de ostras que desovaram.

##### 3.1.1. Percentagem Total de Ostras Desovadas

Pela análise da tabela 7, conclui-se que a análise de variância *One Way* ANOVA não revelou diferenças significativas entre os diferentes tratamentos para um nível de significância de 0,05.

Tabela 7: Análise de variância do efeito do peróxido de hidrogénio a 3mM e 6mM, do pH 9,1 e 9,5 e do esperma esterilizado na indução da desova da ostra *C. gigas*.

Origem de Variação	df	SS	MS	F	P
Entre Grupos	5	0,1379	0,0276	1,06	0,4293
Dentro de Grupos	12	0,3128	0,0261		
Total	17	0,4507			

df= graus de liberdade; SS= soma dos quadrados; MS= quadrado médio;

Tabela 8: Média percentual de ostras de *C. gigas* que desovaram por tratamento (Controlo, Peróxido de Hidrogénio 3mM, Peróxido de Hidrogénio 6mM, pH 9,1, pH 9,5 e esperma esterilizado).

Tratamento	Réplicas	Média (%)
Controlo	3	22,22 ± 0,00
Peróxido de Hidrogénio 3mM	3	25,93 ± 0,06
Peróxido de Hidrogénio 6mM	3	44,44 ± 0,33
pH 9,1	3	22,22 ± 0,11
pH 9,5	3	18,52 ± 0,13
Esperma Esterilizado	3	33,33 ± 0,16

Os valores são médio ± desvio padrão.



Na tabela 8, verifica-se que o tratamento com peróxido de hidrogénio a 6mM foi o que resultou em maior percentagem (44,44%) de ostras desovadas, seguido do tratamento com esperma esterilizado (33,33%). No tratamento com pH 9,5 regista-se a menor percentagem de ostras que desovaram (18,52%). No tratamento controlo e no tratamento com pH 9,1, verifica-se a mesma percentagem de ostras desovadas (22,22%). Contudo não houve diferenças significativas entre a percentagem de ostras que desovaram em cada tratamento.

### 3.1.2. Percentagem Quanto ao Sexo das Ostras Desovadas

A execução do teste não paramétrico Kruskal-Wallis não revelou diferenças significativas entre tratamentos, para um nível de significância de 0,05 (tabela 9).

Em todos os tratamentos registou-se sempre maior número de ostras macho que desovaram. Ocorrendo no tratamento com pH 9,1 100% de desova de ostras macho. No tratamento com esperma esterilizado ocorreu a desova do maior número de ostras fêmea (27,77%). No tratamento com peróxido de hidrogénio 6mM não houve desova de ostras fêmea, assim como no tratamento com pH 9,1, sendo que, no primeiro cerca de 95% das ostras que desovaram eram macho. De salientar que neste tratamento, assim como no tratamento com peróxido de hidrogénio 3mM, ocorreu a desova de duas ostras não diferenciadas, daí que a soma resultante das médias percentuais da desova de machos e fêmeas não seja de 100%.

Tabela 9: Média percentual de ostras macho e fêmea de *C. gigas* que desovaram por tratamento (Controlo, Peróxido de Hidrogénio 3mM, Peróxido de Hidrogénio 6mM, pH 9,1, pH 9,5 e esperma esterilizado).

Tratamento	Réplicas	Média (%)	
		Machos	Fêmeas
Controlo	3	83,33 ± 0,29	16,67 ± 0,29
Peróxido de Hidrogénio 3mM	3	77,77 ± 0,39	11,10 ± 0,19
Peróxido de Hidrogénio 6mM	3	95,23 ± 0,08	0,00 ± 0,00
pH 9,1	3	100,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
pH 9,5	3	77,77 ± 0,39	22,23 ± 0,39
Esperma Esterilizado	3	72,23 ± 0,26	27,77 ± 0,26

Os valores são médio ± desvio padrão.

### 3.1.3. Percentagem Quanto à Etapa das Ostras Desovadas

A aplicação do teste não paramétrico Kruskal-Wallis não revelou diferenças significativas entre tratamentos, para um nível de significância de 0,05 (tabela 10).

No tratamento com esperma esterilizado verificou-se que todas as ostras desovaram durante a etapa 2. Excetuando no tratamento com peróxido de hidrogénio 6mM e no tratamento com pH 9,5, em todos os restantes verificou-se que a maioria das ostras

desovou ao longo da etapa 2. No tratamento controlo e no tratamento com peróxido de hidrogénio 3mM registou-se igual percentagem de ostras que desovaram na etapa 1 e 2, 33,33% e 66,67%, respetivamente.

Comparando os tratamentos com pH 9,1 e pH 9,5 com o tratamento controlo, verifica-se, nos dois primeiros, que ocorreu maior número de ostras desovadas na etapa 1 do que no tratamento controlo. Para além disso no tratamento com pH 9,5 regista-se maior percentagem de ostras que desovaram na etapa 1. Tendo em conta que as soluções de pH foram adicionadas na etapa 2, as ostras que desovaram na etapa 1 não foram induzidas pelo “choque” de pH.

Tabela 10: Média percentual de ostras de *C. gigas* que desovaram durante a etapa 1 e etapa 2 por tratamento (Controlo, Peróxido de Hidrogénio 3mM, Peróxido de Hidrogénio 6mM, pH 9,1, pH 9,5 e esperma esterilizado).

Tratamento	Réplicas	Média (%)	
		Etapa 1	Etapa 2
Controlo	3	33,33 ± 0,29	66,67 ± 0,29
Peróxido de Hidrogénio 3mM	3	33,33 ± 0,29	66,67 ± 0,29
Peróxido de Hidrogénio 6mM	3	69,03 ± 0,27	30,97 ± 0,27
pH 9,1	3	44,43 ± 0,51	55,57 ± 0,51
pH 9,5	3	77,77 ± 0,39	22,23 ± 0,39
Esperma Esterilizado	3	0,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00

Os valores são médio ± desvio padrão.

## 4. Discussão

Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com os pressupostos assentes na indução de moluscos bivalves e, constituem uma opção técnica importante para a indução da desova da ostra *C. gigas* (ou outras espécies) em programas de melhoramento ou de hibridização.

No presente estudo verificou-se que o peróxido de hidrogénio 6mM foi o que resultou em maior percentagem na indução da desova da ostra *C. gigas*, induzindo 44,44% das ostras. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Setyono (2006), que obteve 50% de desova na espécie tropical de haliote (*Haliotis asinina*). Por outro lado Alagarswami e colaboradores (1980) obtiveram cerca de 5% de animais desovados para as concentrações de 3 mM e 6mM, na espécie de ostra perlífera *Pinctada fucata*. Relativamente à proporção de animais macho e fêmea que desovaram, o peróxido de hidrogénio nas duas

concentrações, 3 mM e 6 mM, induziu a desova maioritariamente em ostras macho, 77,77% e 95,23%, respetivamente. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Seytono (2006) que num total de 50% de animais desovados, obteve 30% de haliotes macho e 20% de fêmeas.

Segundo Morse e colaboradores (1977), e apoiado pelos resultados de Alagarswami e colaboradores (1980) e Seytono (2006), durante a exposição de haliotes, vieiras e ostras, ao indutor peróxido de hidrogénio, independentemente da concentração, a totalidade da desova só ocorre aquando da troca de água com o indutor por água nova sem indutor. Contrariamente neste estudo verificou-se que na etapa 1 (etapa na qual o indutor peróxido foi adicionado) ocorreu desova. Sendo que na concentração de peróxido de hidrogénio de 3mM e 6mM a média percentual de animais que desovaram na etapa 1 do procedimento foi de 33,33% e 69,03%. A ocorrência da desova durante a exposição ao peróxido de hidrogénio pode ocasionar a inviabilidade dos gâmetas (Morse, *et al.*, 1977).

Nos dois tratamentos com peróxido de hidrogénio, ocorreu a desova de duas ostras com gâmetas indiferenciados. O uso de indutores químicos pode ocasionar a desova em ostras não maduras (Aji, 2011).

O uso do “choque” de pH como indutor da desova resultou em menor percentagem de ostras que desovaram, quando comparados com os restantes métodos utilizados neste estudo. Segundo Alagarswami e colaboradores (1980) a exposição da ostra perlífera ao pH de 9 como indutor da desova, resultou em 79% de animais desovados, ocasionando a desova de quase 100% de fêmeas.

A utilização do esperma esterilizado de *C. gigas* como indutor da desova mostrou percentagens relativamente satisfatórias (33,33%) quando comparado com os restantes métodos. Segundo Helm e Bourne (2004) e Wallace e colaboradores (2008) a presença de esperma na água induz a desova em ostras.

O choque térmico pretendido neste trabalho, de uma temperatura inicial de 20°C para 26°C, não foi atingido, o que pode ter influenciado negativamente os resultados obtidos neste trabalho. Segundo Helm e Bourne (2004), o choque térmico recomendado para aplicação em hatchery's para desova de moluscos marinhos, pressupõe um diferencial de 10°C, entre a temperatura mais baixa e a mais alta. Além do mais, no estado de Santa Catarina (Brasil) a ostra *C. gigas* desova preferencialmente quando a temperatura da água atinge os 27°C. Desta forma a temperatura desejada de 26°C, aparenta ser indicada para o choque térmico, quando se inicia com uma temperatura de 20°C. Outro motivo que claramente influenciou negativamente os resultados deste estudo, foi o fato de os animais utilizados não estarem completamente maduros. Pois segundo (Aji, 2011) o estado de maturação sexual dos animais é determinante na indução da desova.

## 5. Conclusão

O presente estudo vêm contribuir para o desenvolvimento de uma nova técnica de indução da desova de ostras, com potencial de aplicação em programas de melhoramento e hibridização. Contudo esta técnica carece de mais estudos.

Como não se verificou diferenças significativas entre tratamentos não se pode inferir acerca de qual dos indutores é o mais eficaz na indução da desova da ostra *C. gigas*.

Sugere-se, no sentido de evitar a desova da ostra quando exposta ao peróxido de hidrogénio, a redução da temperatura inicial de 20°C para 18°C, ou menos. Sugere-se ainda, que devem ser efetuados estudos no sentido de verificar o eventual efeito dos indutores nas larvas das ostras. Para isso deve-se proceder à realização de experimentos que envolvam a indução da desova, com os diferentes indutores, e posteriormente à fertilização dos gâmetas femininos com os gâmetas masculinos de um mesmo tratamento, seguido de larvicultura.

Neste tipo de experimentos de indução, recomenda-se o uso de animais completamente maduros, para dissipar eventuais dúvidas quanto ao efeito dos indutores.



## Bibliografia



- Absher, T. M., 1989. Populações naturais de ostras do gênero *Crassostrea* do litoral do Paraná: desenvolvimento larval, recrutamento e crescimento. Tese de Doutorado. São Paulo: Universidade de São Paulo. pp.185.
- Afinowi, M. A., 1984. The mangrove oyster, *Crassostrea gasar* cultivation and potential in the Niger Delta (Nigeria). Nigerian Institute for Oceanography and Marine Research. Lagos. pp. 14.
- Afonso-Dias, M. 2007. Reprodução. Documento de lecionação da disciplina de Biologia Pesqueira, da Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente. Disponível em: [http://w3.ualg.pt/~madias/docencia/documentos/BP0708\\_NotasReproducao.pdf](http://w3.ualg.pt/~madias/docencia/documentos/BP0708_NotasReproducao.pdf).
- Aji, L. P. 2011. Review: Spawning induction in bivalve. Jurnal Penelitian Sains. Vol. 14, No. 2: 1-4.
- Alagarswami, K., Dharmaraj, S., Velayudhan, T. S., Chellam, A. e Victor, A. C. C. 1980. Proceedings of the Symposium on Coastal Aquaculture. Part 2: Molluscan Culture. On controlled spawning of Indian peral oyster *Pinctada fucata* (Gould). pp. 590-597.
- Angell, C. L., 1986. The biology and culture of tropical oysters. Studies and Reviews 13, p. 42. International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines. p. 50.
- Ansa, E. J. e Bashir, R. M., 2007. Fishery and culture potentials of the mangrove oyster (*Crassostrea gasar*) in Negeria. Research Journal of Biological Sciences. Vol. 2(4): 392-394.
- AquaBio Consultants Limited. 2006. A learning resource: Biology of Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). Disponível em: <http://www.seafoodito.co.nz>.
- Auburn University, 2012. Oyster Pediveliger. Acedido a 16 de Agosto de 2012, disponível em: <http://www.auburn.edu/>.
- Barber, B.J., e Blake, N.J., 1991. Reproductive Physiology. Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture, Developments in Aquaculture and Fisheries Science. Amsterdão. Vol. 21: 377-428.
- Beiras, R. e Widdows, J., 1995. Induction of metamorphosis in larvae of the oyster *Crassostrea gigas* using neuroactive compounds. Marine Biology. Vol. 123: 327-334.
- Boudry, P. 2008. Review on breeding and reproduction of european aquaculture species. Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Infremer, France. Disponível em: [www.aquabreeding.eu](http://www.aquabreeding.eu).
- Braley R.D. 1998. Sedimentation rates associated with the longline culture of the blacklip pearl oyster *Pinctada margaritifera* at Penrhyn Atoll Cook Islands. Disponível em: <http://www.aquasearch.net.au/aqua/pearloysters.htm>.
- Christo, S. W., Absher, T. M. e Boehs, G. 2010. Morphology of the larval shell of three oyster species of the genus *Crassotrea* Sacco, 1887 (Bivalvia: Ostreidae). Brazilian Journal of Biology. Vol. 70 (3): 645-650.

- Coon S. L. e Bonar, D. B. 1986. Norepinephrine and dopamine content of larvae and spat of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Biol. Bull. Vol. 171: 632-639.
- Coon, S. L., Fitt, W. K. e Bonar, D. B. 1990. Competence and delay of metamorphosis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Marine Biology. Vol. 106: 379-387.
- Devakie, M. N. e Ali, A. B. 2000. Salinity-temperature and nutritional effects on the setting rate of larvae of the tropical oyster, *Crassostrea iredalei* (Faustino). Aquaculture. Vol. 184: 105-114.
- Devauchelle, N., Girard, J. P. e Cosson, J. 1998. Waves characteristics oi oyster, *Crassostrea gigas*, sperm obtained after hormonally induced spawning in sea water. Disponível em: [www.archimer.ifremer.fr/doc/00049/16024/13485.pdf](http://www.archimer.ifremer.fr/doc/00049/16024/13485.pdf).
- Dupuy, C., Vaquer, A., Lam-Hoai, T., Rougier, C., Mazouni, N., Lautier, J., Collos, Y. e Gall, S. L., 2000. Feeding rate of the oyster *Crassostrea gigas* in a natural planktonic community of the Mediterranean Thau Lagoon. Marine Ecology Progress Sreies. Vol. 205: 171-184.
- Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – EPAGRI. (2012). Aquicultura e Pesca. Estatísticas da Aquicultura. Acedido a 20 de Agosto de 2012, disponível em: <http://cedap.epagri.sc.gov.br/>.
- Ferreira, J. F., Silva, F. C., Gomes, C. H. A. M. e Ferreira, F. M., 2011. Produção programada e rastreabilidade de larvas e sementes de moluscos em Santa Catarina. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte. Vol. 35: 192-197.
- Filho, J. D. S., 2004. O agronegócio da aquicultura: perspectivas e tendências. Texto apresentado no Zootec 2004 – Zootecnia e o Agronegócio, Brasília. pp. 9.
- Fisheries and Oceans Canada. 2012. *Crassostrea gigas*. Acedido a 16 de Agosto de 2012, disponível em: <http://www.dfo-mpo.gc.ca>.
- Fitt, W. K. Labare, M. P., Fuqua, W. C., Walsh, M., Coon, S. L., Bonar, D. B., Colwell, R. R. e Weiner, R. M. 1989. Factors influencing bacterial production of inducers settlement behavior of larvae of the oyster *Crassostrea gigas*. Microbiology Ecology. Vol. 17: 287-298.
- Fitt, W. K., Coon, S. L., Walch, M., Weiner, R. M., Colwell, R. R. e Bonar, D. B., 1990. Settlement behavior and metamorphosis of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in response to bacterial supernatants. Marine Biology. Vol. 106: 389-394.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO. (2021). *Crassostrea gigas*. Acedido a 15, 16, 20 e 25 de Agosto de 2012, disponível em: <http://www.fao.org>.
- García-Lavandeira, M., Silva, A., Abad, M., Pazos, A. J., Sánchez, J. L. e Pérez-Parallé, M. L., 2005. Effects of GABA and epinephrine on the settlement and metamorphosis of the larvae of four species of bivalve molluscs. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. Vol. 316: 149–156.



- Gibbons, M. C. e Castagna, M. 1984. SEROTONIN AS AN INDUCER OF SPAWNING IN SIX BIVALVE SPECIES. Short Communication. Aquaculture. Vol. 40: 189-191.
- Gomes, C. H. A. M., 2009. Ciclo reprodutivo da ostra *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819) em cultivo e maturação em laboratório. Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Aquicultura, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis/SC. pp. 57.
- Helm, M. M. e Bourne, N., 2004. Hatchery culture of bivalves: A practical manual. FAO Fisheries Technical Paper 471. Roma. pp. 203.
- Hidu, H., e Haskin, H. H., 1971. Setting of the American oyster related to environmental factors and larval behavior. Proceedings of the National Shellfisheries Association. Vol. 61: 35- 49.
- Junior, N. S., Brognoli, F. F., Fischer, C. E., Couto, F. R. e Almeida, M. C., 2006. Assentamento remoto de larvas de mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758). Comunicação técnica apresentada ao IV Congresso Ibero-americano Virtual de Acuicultura. Disponível em: (<http://www.civa2006.org>), 1-6.
- Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina – LMM-UFSC. 2012. Acedido em 16, 17 e 20 de Agosto de 2012, disponível em: <http://www.lmm.ufsc.br>.
- Lango-Reynoso, F., Chávez-Villalba, J., Cochard, J. C. e Le Pennec, M. 2000. Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquaculture. Vol. 190: 183-199.
- Lapègue, S., Boutet, I., Leitão, A., Heurtebise, S., Garcia, P., Thiriotuie-Vreux, C., e Boudry, P., 2002. Trans-Atlantic distribution of a mangrove oyster species revealed by 16S mtDNA and karyological analyses. Biological Bulletin. Vol.202: 232-242.
- Lavinas, A. F., Villaça, R. C. e Saad, A. M., 2008. Evaluation of the growth and mortality of the oysters (*Crassostrea gigas*, Thunberg, 1795) in the Sea Farm In Arraial Do Cabo, RJ. Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo. Vol. 34(4): 497-504.
- Manzoni, G., 2001. Ostras: aspetos bioecológicos e técnicas de cultivo/ coordenação de Gilberto Manzoni. Centro de Ciências Tecnológicas do Mar, Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI). Santa Catarina. pp. 30.
- Martinez, G., Mettifogo, L., Perez, M. A. e Callejas, C. 2007. A method to eliminate self-fertilization in a simultaneous hermaphrodite scallop. 1. Effects on growth and survival of larvae and juveniles. Aquaculture. Vol. 273: 459-469.
- Melo, C. M. R., Silva, F. C., Gomes, C. H. A. M., Solé-Cava, A. M. e Lazoki, C., 2010. *Crassostrea gigas* in natural oyster banks in Brazil. Biol. Invasions. Vol. 12: 441-449.
- Miossec, L., Deuff, R-M. e Goulletquer, P., 2009. Alien species alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster). ICES Cooperative Research Report No. 299. pp. 42.

- Mizuta, D. D., 2010. Contribuição do estudo oceanográfico para a produção comercial de ostras *Crassostrea gigas*: estudo de caso da Baía Sul, Ilha de Santa Catarina, SC. Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. São Paulo. pp. 126.
- Morse, D. E., Duncan, H., Hooker, N. e Morse, A. 1977. Hydrogen peroxide induces spawning in mollusks, with activation of prostaglandin endoperoxidase synthetase. Science. Vol. 196: 298-300.
- Neo, M. L., Todd, P. A., Chou, M. L. e Teo L-M. 2011. Spawning induction and larval development in the fluted giant clam, *Tridacna squamosa* (Bivalvia: tridacnidae). Nature in Singapore. Vol. 4: 157-161.
- Oyster Gardening For Restoration & Education. 2012. Oyster life cycle. Acedido a 16 de Agosto de 2012, disponível em: <http://www.mdsq.umd.edu>.
- Pereira, O. M., Machado, I. C., Henriques, M. B. e Yamanaka, N., 2001. Crescimento da ostra *Crassostrea brasiliana* semeada sobre tabuleiro em diferentes densidades na região estuarino-lagunar de Cananéia-SP (25°S, 48°W). Boletim do Instituto de Pesca. Vol. 27(2): 163-174.
- Pie, M. R., Ribeiro, R. O., Boeger, W. O., Ostrensky, A., Falleiros, R. M. E Angelo, L., 2006. A simple PCR-RFLP method for the discrimination of native and introduced oyster species (*Crassostrea brasiliiana*, *C. rhizophorae* and *C. gigas*; Bivalvia: Ostreidae) cultured in Southern Brazil. Aquaculture Research. Vol. 37: 1598-1600.
- Quayle, D. B. e Newkirk, G. F., 1989. Farming bivalve molluscs: Methods for study and development. Advances in World Aquaculture. Canada. Vol. 1. pp. 307.
- Quayle, D. B., 1980. Tropical oysters: culture and methods. International Research Center. Ottawa. pp. 80.
- Ramos, C. O. 2011. Ciclo gonádico da ostra nativa *Crassostrea gasar* em laboratório. Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Aquicultura, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis/SC. pp. 84.
- Rico-Villa, B., Le Coz, J. R., Mingant, C. e Robert, R. 2006. Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquaculture. Vol. 256: 377-388.
- Rico-Villa, B., Pouvreau, S. e Robert, R. 2009. Influence of food density and temperature on ingestion, growth and settlement of Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. Aquaculture. Vol. 287: 395-401.
- Rios, E. C. 1994. Seashells of Brazil. Fundação Universidade do Rio Grande, Rio Grande, Brazil.
- Rios, E. C. 2009. Compendium of brazilian seashells of Brazil. Fundação Universidade do Rio Grande, Rio Grande, Brazil. pp. 368.

- Rodríguez, S. R. Ojeda, F. P. e Inestrosa, N. C., 1993. Settlement of benthic marine invertebrates. Marine Ecology Progress Series. Vol. 97: 193-207.
- Sarkis, S. e Lovatelli, A., 2007. Installation and operation of a modular bivalve hatchery. FAO Fisheries Technical Paper 471. Roma. pp. 201.
- Setyono, D. E. D. 2006. Induction spawning for the tropical abalone (*haliotis asinina*) in the laboratory. Indonesian Aquaculture Journal. Vol. 1:1.
- Silva, C. C., e Silva, J. C., 2007. Dossiê Técnico: Cultivo de ostras. Disponível em: Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas – SBRT – Disponível em: <http://www.respostatecnica.org.br>
- Solon, E. M., 1984. Hatchery development of marine bivalve molluscs. A final report submitted to Oregon State University. In partial fulfillment for the degree of Master of Science. pp. 59.
- Tan, S. H. e Wong, T. M. 1996. Effect of salinity on hatching, larval growth, survival and settling in the tropical oyster *Crassostrea belcheri* (Sowerby). Aquaculture. Vol. 145: 129-139.
- Teh, C. P., Zulfigar, Y. e Tan, S. H., 2012. Epinephrine and I-DOPA promote larval settlement and metamorphosis of the tropical oyster, *Crassostrea iredalei* (Faustino, 1932): An oyster hatchery perspective. Aquaculture. Vol. 338–341:260–263.
- Tureck, T. R. 2010. Sementes de ostras nativas no litoral de Santa Catarina/Brasil, como subsidio ao cultivo. Dissertação de doutoramento apresentada ao programa de Pós-graduação em Aquicultura, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis/SC. pp. 140.
- Varela, E. S., Beasley, C. R., Schneider, H., Sampaio, I., Marques-Silva, N. S. e Tagliaro, H., 2007. Molecular phylogeny of mangrove oysters (*Crassostrea*) from Brazil. Journal of Molluscan Studies. Vol. 73: 229-234.
- Velasco, L. A., Barros, J. e Acosta, E. 2007. Spawning induction and early development of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus*. Aquaculture. Vol. 266: 153-165.
- Vieira, K. S., 2010. Processo de larvicultura para diferentes espécies de bivalves produzidos no LMM-UFSC. Trabalho apresentado à disciplina de estágio II. Florianópolis/SC. pp. 48.
- Wallace, R. K., Waters, P. e Rikard, F. S. 2008. Oyster Hatchery Techniques. Southern Regional Aquaculture Center. Publication No. 4302.
- Wang, C. e Croll, R. P. 2006. Effects of sex steroids on spawning in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. Aquaculture. Vol. 256: 423-432.





Anexos



## Anexo I - Figuras



Figura 8: Fotografia do sistema utilizado no assentamento da ostra *C. gasar*, sobre o efeito de temperatura.



Figura 9: Fotografia do sistema utilizado no assentamento da ostra *C. gasar*, sobre o efeito de salinidade.





Figura 10: Fotografia (1) da disposição dos baldes e calhas utilizados na indução da desova da ostra *C. gigas*.



Figura 11: Fotografia (2) da disposição dos baldes e calhas utilizados na indução da desova da ostra *C. gigas*.



## Anexo II – Tabelas

Tabela 11: Concentrações ( $\times 10^4$  células/ml) de microalga fornecidas ao longo de 24 dias de larvicultura da ostra *C. gasar*.

Dia	Alimentação – ( $\times 10^4$ células/ml)			
	ISO	CM	PAV	Concentração Final
1	1,0	0,6	0,4	2,0
2	1,0	0,6	0,4	2,0
3	0,7	0,6	0,7	2,0
4	1,8	1,2	-----	3,0
5	2,4	1,6	-----	4,0
6	2,4	1,6	-----	4,0
7	1,6	2,4	-----	4,0
8	1,6	2,4	-----	4,0
9	1,6	2,4	-----	4,0
10	1,6	2,4	-----	4,0
11	3,0	2,0	-----	5,0
12	2,0	2,0	2,0	6,0
13	2,4	3,6	-----	6,0
14	2,4	3,6	-----	6,0
15	0,9	3,0	2,1	6,0
16	0,9	3,0	2,1	6,0
17	0,9	3,0	2,1	6,0
18	0,6	3,6	1,8	6,0
19	1,2	3,6	1,2	6,0
20	1,2	3,6	1,2	6,0
21	1,0	4,8	1,0	6,8
22	1,2	3,6	1,2	6,0
23	1,0	3,0	1	5,0
24	0,9	2,1	-----	3,0

